

# Der Einfluss von Phosphodiesterasen auf kontraktile Zellen des menschlichen Hodens und Nebenhodens

INAUGRALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Caroline Feuerstacke

(Diplombiologin)

aus Heudeber

Gießen 2014



Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
AG Signaltransduktion  
(Prof. Dr. R. Middendorff)

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

2. Gutachter : Prof. Dr. Klaus Steger

Tag der Disputation: 23.07.2015





*Für meine Familie und Freunde*

*I want to believe...*



## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
<u>1.1 Aufbau des Hoden</u>	13
1.1.1 Tubuli seminiferi concorti: Aufbau des intratubulären Keimepithels (Sertoli-Zellen und Keimzellen)	14
1.1.2 Kinetik Spermiogenese	17
1.1.3 Interstitium und Leydigzellen: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese	17
1.1.4 Aufbau und Charakterisierung der Lamina propria des Menschen	18
1.1.5 Keimzelldefekte	20
1.1.6 Verdickung der Lamina propria	21
1.1.7 Charakteristika der Lamina propria der Ratte	23
1.1.8 Isolierte Lamina propria Zellen von Mensch und Ratte	24
<u>1.2 Aufbau des Nebenhoden</u>	27
1.2.1 Allgemeiner Aufbau des Epithels	28
1.2.2 D. epididymidis: Muskelzellschicht und Kontraktilität	29
1.2.3 Störungen im Wandaufbau des D. epididymidis	32
1.3 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-System: Kontraktion und Relaxation von glatten Muskelzellen	33
1.3.1 Kontraktion der glatten Muskelzellen	34
1.3.2 cGMP-Signalweg und dessen Einfluss auf die Relaxation glatter Muskelzellen	35
1.3.3 Rolle der Phosphodiesterasen	40
1.3.4 Einteilung, Nomenklatur und Aufbau der Phosphodiesterasen	41
1.3.5 Phosphodiesterase-Genfamilien	44
1.3.5.1 cGMP-spezifische Phosphodiesterasen	44
1.3.5.1.1 PDE5	44
1.3.5.1.2 PDE6	45
1.3.5.1.3 PDE9	45
1.3.5.2 Dual-spezifische Phosphodiesterasen (cAMP- und cGMP-degradierende PDEs)	46
1.3.5.2.1 PDE1	46

1.3.5.2.2 PDE2	47
1.3.5.2.3 PDE3	48
1.3.5.2.4 PDE10	48
1.3.5.2.5 PDE11	49
1.3.5.3 cAMP-spezifische Phosphodiesterasen	50
1.3.5.3.1 PDE4	50
1.3.5.3.2 PDE7	50
1.3.5.3.3 PDE8	51
1.3.6 PDEs im Hoden und Nebenhoden	52
 <b>2 Zielsetzung</b>	 <b>53</b>
 <b>3 Material und Methoden</b>	 <b>55</b>
3.1 Materialien	55
3.1.1 Geräte	55
3.1.2 Kits	55
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	56
3.1.4 Lösungen	56
3.1.5 Inhibitoren	58
3.1.6 Primäre Antikörper	58
3.1.6.1 Fluoreszenz-Immunhistochemie	58
3.1.6.2 Western Blot	58
3.1.7 Sekundäre Antikörper	58
3.1.7.1 Fluoreszenz-Immunhistochemie	59
3.1.7.2 Western Blot	59
3.2 Herkunft des Patientenmaterials	59
3.3 Behandlungen der Proben vor der Mikrodissektion	59
3.4 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM)	60
3.5 Molekularbiologische Methoden	60
3.5.1 RNA-Isolierung aus Geweben	60
3.5.2 RNA-Isolierung aus Laser-mikrodisseziertem Gewebe	61
3.5.3 RNA-Isolierung der humanen Hoden-Primärzellen	61

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	61
3.5.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	61
3.5.6 Oligonukleotide (Primer)	63
3.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
3.5.7.1 PCR-Ansatz mit Template-cDNA von ganzen Geweben	65
3.5.7.2 PCR-Ansatz mit Template-cDNA von gepickten Proben	66
3.5.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	67
3.5.9 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)	67
3.6 Zellbiologische Methoden	70
3.6.1 Kultivierung und Passagierung peritubulärer Zellen des menschlichen Hodens	70
3.6.2 Kryokonservierung	72
3.6.3 Fluoreszenz-Immun-Färbung an peritubulären Primärzellen	72
3.6.4 Kultivierung klassischer Muskelzellen: Muskelzellen der Lungenarterie (HPASMCs) und Prostata (HPrSMCs)	74
3.7 Proteinbiochemische Methoden	
3.7.1 Proteinisolierung aus ganzen Hodenschnitten der Ratte	74
3.7.2 Proteinisolierung aus gepicktem Hodengewebe von Ratte und Mensch	74
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	77
3.7.4 Western Blot	78
3.8 Funktionelle Untersuchungen	79
3.8.1 Organbad-Studien	79
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>81</b>
4.1 <u>Untersuchungen im Hoden</u>	81
4.1.1 PDE-Isoformen im Hoden des Menschen	81
4.1.2 Einführung in die modifizierte Methode der Laser-Capture-Mikrodissektion am Beispiel der zelltypspezifischen Expression von PDE5A im Hoden	84
4.1.3 Expression ausgewählter PDE-Isoformen in der unverdickten, normalen Lamina propria	86
4.1.4 Expression der PDE-Isoformen in der pathologisch verdickten Lamina propria	88
4.1.5 Vergleich der PDE-Isoformen, die gleichzeitig in	

unverdickter und verdickter LP nachgewiesen werden konnten	89
4.1.6 Vergleich der PDE-Isoformen, die weder in unverdickter LP noch verdickter LP exprimiert sind	90
4.1.7 Besonderheiten bei der Lokalisierung einiger PDE-Isoformen	91
4.1.8 Isolierung peritubulärer Zellen aus der Lamina propria menschlicher Hodenbiopsien	95
4.1.9 Quantifizierung der PDE-Isoformen in unverdickter und verdickter Lamina propria	97
4.1.9.1 PDE1C-Expression bei verdickter LP- Vergleich von Laser-mikrodissezierten LP-Proben mit kultivierten peritubulären Zellen	106
4.1.10 Qualitative und quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Immun-Färbung menschlicher peritubulärer Zellen	108
4.1.11 Genexpressionsanalysen spezifischer kontraktile und Bindegewebsmarker in kultivierten, klassischen Muskelzellen	121
4.1.12 Etablierung der Laser-Capture-Mikrodissektion zum Nachweis von Proteinen mittels Western Blot am Beispiel des cGMP- produzierenden Membranproteins GC-A im Rattenhoden	126
4.1.13 Nachweis von PDE2A in Laser-mikrodissezierten Tubuli seminiferi des Menschen	130
4.1.14 sGC-Expression in Laser-mikrodissezierten Tubuli seminiferi des menschlichen Hoden	132
4.2 <u>Untersuchungen im Nebenhoden</u>	133
4.2.1 Nachweis spezifischer Komponenten des cGMP-Signalweges in der Ratte	133
4.2.2 Exakte Lokalisierung der Transkripte cGMP-bildenden Proteine GC-A, GC-B und sGC im Nebenhoden der Ratte	134
4.2.3 Relative Expression verschiedener PDE-Isoformen in Caput, Corpus und Cauda	135
4.2.4 Lokalisierung spezifischer PDE-Isoformen in der Muskelschicht Des Cauda-Abschnittes	138
4.2.5 Lokalisierung spezifischer PDE-Isoformen in glatten Muskelzellen des humanen Nebenhodengangs	140
4.2.6 Vergleich der Lokalisation spezifischer PDE-Isoformen im Nebenhoden von Mensch und Ratte	142
4.2.7 Kontraktionsstudien am Nebenhodengang der Ratte	143
4.2.7.1 PDE2-Inhibition durch BAY60-7550	145

4.2.7.2 PDE3-Inhibition durch Trequinsin	147
4.2.7.3 PDE1-Inhibition durch Dioclein	148
<b>5 Diskussion</b>	<b>149</b>
5.1.1 Vor- und Nachteile der Laser Capture Mikrodisektion	149
5.1.2 PDE1C-Expression in peritubulären Zellen	152
5.1.3 Verlieren peritubuläre Zellen bei Verdickung ihre kontraktile Funktion?	158
5.1.4 Quantitativer Nachweis von PDE-Isoformen in peritubulären Zellen unterschiedlichen pathologischen Ursprungs	160
5.1.5 Fehlende Expression einiger PDE-Isoformen in der Lamina propria des Hoden	164
5.1.6 Verhältnis von Bindegewebs- und kontraktile Markern im Zellmodell peritubulärer Zellen	167
5.1.7 Vergleich der verwendeten Markergene mit „klassischen“ Muskelzellen	169
5.1.8. Analyse des Phänotyps peritubulärer Zellen der unverdickten und verdickten Lamina propria	170
5.2 <u>Nebenhoden</u>	173
5.2.1 Lokalisierung und Funktion von PDEs im NH-Gang	173
5.2.1.1 PDE5	173
5.2.1.2 PDE3	175
5.2.1.3 PDE1	177
5.2.1.4 PDE2	179
5.2.1.1 Lokalisation von Faktoren des NO/cGMP-Systems im Nebenhoden des Menschen und der Ratte	180
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>183</b>
<b>7 Summary</b>	<b>185</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>187</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>189</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis</b>	<b>193</b>
<b>11 Literaturverzeichnis</b>	<b>195</b>

<b>12 Publikationen, Vorträge und Poster</b>	<b>221</b>
<b>Erklärung</b>	<b>225</b>
<b>Danksagung</b>	<b>227</b>



# 1 Einleitung

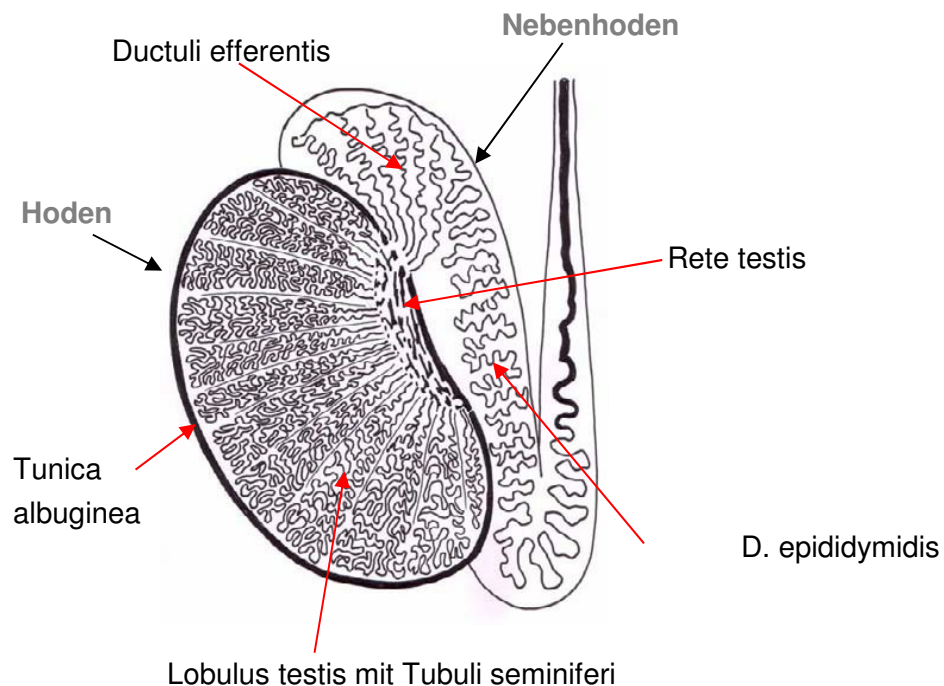
## 1.1 Aufbau des Hodens

Der männliche Genitaltrakt ist komplex aufgebaut und besteht aus den Gonaden, dem Nebenhoden (Epididymis), dem Samenleiter (Ductus deferens), den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, d.h. der Bläschendrüse (Glandula vesiculosa), der Vorsteherdrüse (Prostata) und der Cowperschen Drüse (Glandula bulbourethralis) und dem männlichen Glied (Penis) (Ulrich Welsch. Sobotta Lehrbuch Histologie). Der Hoden (Testis) hat die Aufgabe sowohl die männlichen Keimzellen als auch die männlichen Sexualhormone (Androgene) zu produzieren und dient gleichzeitig als exokrine (Spermatogenese) und endokrine (Steroidsynthese) Drüse.

Der Hoden eines erwachsenen Mannes hat einen Durchmesser von ca. 30mm und ein Volumen von 20-25ml. Der Hoden liegt außerhalb des Körpers im Hodensack (Skrotum) und ist von einer derben Bindegewebskapsel, der Tunica albuginea, umgeben. Diese weist Fibroblasten, Kollagenfasern und auch glatte Muskelzellen auf, die zur physiologischen Aufrechterhaltung des interstitiellen Drucks, Regelung des Blutflusses und Transport der Samenzellen (Spermatozoen) aus dem Hoden in Richtung Nebenhoden (NH) beitragen (Chocu *et al.*, 2012; Middendorff *et al.*, 2002; Setchell BP, 1994). Die Tunica albuginea umschließt das Hodengewebe (Hodenparenchym) und bindegewebsartige Septen (Septula testis) gliedern diese in ca. 350 Läppchen (Lobuli testis). Ein Lobulus testis enthält 1-4 stark gewundene Samenkanälchen (Tubuli seminiferi concorti) in denen die Entwicklung der Samenzellen stattfindet. Ein intertubulärer Raum aus Bindegewebe umgibt die Tubuli seminiferi und wird auch Interstitium genannt (Krause, Weidner, Sperling, Diemer. Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane).

Im Inneren der Tubuli seminiferi werden die unbeweglichen und noch nicht befruchtungsfähigen Spermatozoen bis zu einem Kanalsystem (Rete testis) transportiert, welches an das darauffolgende Organ, den NH, angrenzt. Die Spermatozoen müssen nun durch ein Gangsystem aus 10-20 Kanälchen (Ductuli efferentes) geleitet werden, die sich schließlich zu einem Gang (D. epididymis) vereinen. Die ausdifferenzierten

Spermien passieren letztendlich den Samenleiter und die Harnröhre (Urethra) bis sie über das männliche Begattungsorgan ausgestoßen werden können.



**Abb. 1: Schema des Hodens und Nebenhodens** nach A.F. Holstein (Holstein *et al.*, 2003)

#### 1.1.1 Tubuli seminiferi concorti:

##### Aufbau des intratubulären Keimepithels (Sertoli-Zellen und Keimzellen)

Der menschliche Hoden besteht aus ca. 600 Tubuli seminiferi. Diese sind stark gewunden und besitzen einen Durchmesser von 180-280µm und eine Länge von 30-80cm. Das Keimepithel der Tubuli seminiferi hat eine durchschnittliche Höhe von 60-80µm (Krause, Weidner, Sperling, Diemer. Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane). Es besteht aus somatischen, pyramidenähnlichen Zellen (Sertoli-Zellen), die die Keimzellen umschließen. Die Abgrenzung des Keimepithels zum interstitiellen Raum übernimmt die Lamina propria (LP).

Die Sertoli-Zellen gewährleisten während der Embryonalentwicklung die Rückbildung des Müller-Gangs durch die Sekretion des anti-Müller-Hormons (AMH) (Josso *et al.*, 2001; Mackay, 2000; Sajjad, 2010). Ab der Pubertät erfüllen diese hochprismatischen Zellen vielfältige Aufgaben, wie die Stütz- und Nährstoffzufuhr der Spermatozoen.

Phagozytose, Sekretion intratubulärer Samenflüssigkeit zusätzlich zur Synthese und Sekretion verschiedener Proteine (Transferrin, Androgen-bindendes Protein (ABP), Occludin, Vinculin u.a. (Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006a). Nach dem Erreichen des adulten Lebensabschnitts werden sie mitotisch inaktiv.

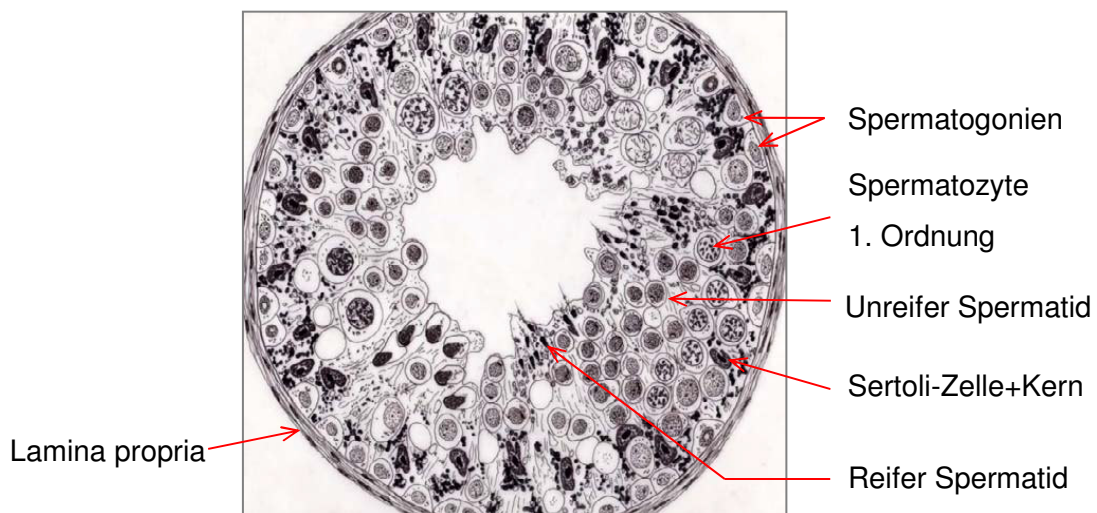
Die Anzahl der Sertoli-Zellen bestimmt die Anzahl der täglich gebildeten Spermatozoen. Eine Dedifferenzierung von Sertoli-Zellen, (erkennbar z.B. durch Persistenz der AMH-Expression, Proliferation oder erneute Expression fetaler Marker, wie z.B. Cytokeratin 18) führt dadurch zwangsweise zu einer qualitativen und quantitativen Reduktion der Spermatogenese (Sharpe *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006b). Somit sind diese Zellen von essentieller Bedeutung für eine korrekte Keimzellentwicklung.

Sertoli-Zellen sind durch tight junctions verbunden. Diese parazelluläre Barriere öffnet sich nur, wenn die Keimzellen während der fortschreitenden Reifephase in Richtung Lumen migrieren. Diese Diffusionsbarriere teilt das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment, sodass verschiedene Milieus entstehen. Diese Barriere wird auch Blut-Hoden-Schranke genannt (Kaur *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 1980) und ermöglicht den Keimzellen Schutz vor dem Immunsystem des Körpers (Griswold, 1998; Hedger, 2011).

Der präsenteste Zelltyp im Keimepithel sind die Keimzellen in denen die Spermatogenese von statten geht (Abb. 2). Der Prozess der Keimzellentwicklung ist sehr komplex und hoch organisiert. Die Entwicklung beginnt mit den basal lokalisierten Spermatogonien und schreitet adluminal voran. Man unterscheidet zwei Arten von Spermatogonien: Typ A und B. Sie sind histologisch anhand der Struktur ihres Zellkerns leicht voneinander zu unterscheiden. Die Spermatogonien des Typs A besitzen einen diploiden Chromosomensatz, sind mitotisch aktiv und werden als Stammzellreservoir betrachtet. Nach der Teilung verbleibt eine Tochterzelle als A-Spermatogonie, während die andere sich zu einer B-Spermatogonie entwickelt, die den Kontakt zur Basallamina lösen kann. Aus mitotischen Teilungen der B-Spermatogonien gehen die Spermatozyten I. Ordnung hervor. Diese sind während der ersten meiotischen Teilung die größten unter den Keimzellen und man kann verschiedene Stadien der Prophase I der Meiose (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän, Diakinese) im Kern

beobachten. Aus der Teilung eines Spermatozyten I gehen zwei Spermatozyten II hervor, die in der zweiten meiotischen Teilung zu haploiden Spermatiden reduziert werden.

In der nun folgenden Spermiogenese reifen die Spermatiden und differenzieren sich zu Spermatozoen. Die Differenzierung erfolgt in drei Entwicklungsstufen: Kernkondensation, Akrosombildung und Entwicklung der Geißel. Während der Kernkondensation wird das Karyoplasma auf 10% des ursprünglichen Volumens verdichtet. Die darauf folgende Akrosombildung erfolgt über die Abschnürung primärer Lysosomen aus dem Golgi-Apparat, die anschließend an den Kern gelagert werden (Kappenbildung). Im Akrosom befinden sich eine Reihe hydrolytischer Enzyme, die das Eindringen des Spermiums in die Zona pellucida der Eizelle erleichtern. Die Bildung der Geißelstrukturen (Axonema) entsteht aus Zentriolen, die sich zu Mikrotubulusstrukturen der Kinozilie (9x2+2-Muster) formen. Die ausgereiften Spermatiden drehen sich im Keimepithel, sodass der Schwanz Richtung Lumen zeigt. Während dem Vorgang der Spermiatio werden die Spermatiden durch peristaltische Bewegungen der LP aus dem Lumen entlassen und können dann erst als Spermatozoen bezeichnet werden.



**Abb. 2: Querschnitt eines Tubulus seminiferus**

Verschiedene Keimzell-Stadien wurden in einem Schema von A.F. Holstein dargestellt. (Holstein *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Kinetik der Spermiogenese

Die Anzahl der Spermatogenese-Stadien und die Dauer des Spermatogenese-Zyklus sind artspezifisch verschieden. Beim Menschen wurden 6 solcher Spermatogenese-Stadien festgestellt, während in der Ratte 14 und in der Maus 12 Stadien beschrieben sind. Im Gegensatz zum Nager lassen sich beim Menschen sogar mehrere Spermatogenese-Stadien innerhalb eines Tubulusquerschnitts erkennen (multi-stage-arrangement; (Johnson *et al.*, 1996; Luetjens *et al.*, 2005; Schulze *et al.*, 1984). Die Keimzell-Stadien im Menschen folgen einer bestimmten räumlichen Ordnung, sodass Keimzellen gleichen Entwicklungsstadiums spiralförmig innerhalb eines Tubulus seminiferus verlaufen.

Die Dauer eines Spermatogenese-Zyklus beträgt beim Menschen ca. 74 Tage, während er bei der Ratte ca. 52 Tage in Anspruch nimmt (Clermont, 1972; Hermo *et al.*, 2010). Der Transport der Spermien durch den NH-Gang beträgt weitere 8-17 Tage. So kann es mindestens 82 Tage vom Beginn der Spermatogenese bis zum Erscheinen der Spermien im Ejakulat dauern.

### 1.1.3 Interstitium und Leydigzellen: Hormonelle Steuerung der Spermatogenese

Die Tubuli seminiferi sind in amorpher extrazelluläre Matrix und lockerem Bindegewebe eingebettet (Interstitium). Neben den Leydigzellen befinden sich auch Nerven, Blutgefäße, Lymphgefäße und Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Mastzellen) im Interstitium. Leydigzellen produzieren als Hauptprodukt der Steroidbiosynthese das männliche Geschlechtshormon Testosteron. Testosteron hat im Wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung des männlichen Phänotyps, der Geschlechtsentwicklung und der Fertilität über den Einfluss auf die Spermatogenese.

Die endokrine Regulation der Hodenfunktion beginnt allerdings im Gehirn durch den Hypothalamus und die Hypophyse (Franchimont *et al.*, 1975; Hotaling *et al.*, 2014). Dort wird die Vermehrung, Reifung und Differenzierung der Keimzellen über einen komplexen Regelkreis gesteuert. Das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) induziert die Produktion der gonadotropen Hormone luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) in der Hypophyse (Counis *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2014). Beide Hormone werden pulsatil

abgegeben und finden ihren Wirkungsort im Hoden, wo sie für die Produktion und Reifung der Keimzellen verantwortlich sind. LH kann über spezifische LH-Rezeptoren an Leydigzellen binden und die Produktion von Testosteron und anderer Androgene anregen (Huhtaniemi *et al.*, 1995). Eine Regulation des Testosteronspiegels im Blut wird über das Hypothalamus-Hypophysen-System gesteuert.

Testosteron nimmt über Androgenrezeptoren (AR) einen Einfluss auf andere Zellen im Hoden. Der AR wird im Hoden vor allem in Sertoli-, Leydig-, Endothel- und peritubulären Zellen exprimiert (Bergh *et al.*, 1992; Bremner *et al.*, 1994; Sar *et al.*, 1990; Vornberger *et al.*, 1994). Vereinzelt wurde der AR auch immunhistochemisch in Keimzellen nachgewiesen, aber ein eindeutiger Beleg fehlt bislang (Kimura *et al.*, 1993; Lubahn *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1996). FSH bindet an FSH-Rezeptoren der Sertoli-Zellen und fördert so indirekt die Reifung und Differenzierung von Keimzellen während der Spermatogenese (Hermann *et al.*, 2007). Bei zu hoher Testosteron-Ausschüttung sorgen mehrere Feedback-Mechanismen für einen ausgeglichenen Hormonspiegel im Blut. Das in den Sertoli-Zellen gebildete Proteohormon Inhibin hemmt die FSH-Bildung im Hypophysenvorderlappen (Suresh *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 Aufbau und Charakterisierung der Lamina propria des Menschen

Beim Menschen wird die 7-10µm dicke LP durch eine Basallamina, welche aus Kollagen Typ I und III sowie Laminin besteht, vom Keimepithel abgegrenzt. Die LP besteht aus sogenannten Myofibroblasten, Fibroblasten und zwischengelagerter, vornehmlich aus Kollagenfasern bestehender extrazellulärer Matrix. Die Zellen umgeben in konzentrischen aber diskontinuierlich angelegten Schichten die Tubuli seminiferi (Holstein *et al.*, 1996). Myofibroblasten sind lange, flache Zellen, die einzeln in einem Netzwerk aus Mikrofibrillen und Kollagenfasern eingebettet sind (Holstein *et al.*, 1996) Der Begriff Myofibroblast wurde aufgrund der elektronenmikroskopischen Beobachtung von „spezialisierten“ Fibroblasten etabliert, die morphologische Beziehungen zu glatten Muskelzellen zeigten (Bock *et al.*, 1972). Immunhistochemisch konnte dies durch Koloalisation von Desmin und Vimentin in den inneren 3 bis 4 Zellschichten der LP belegt werden. Zusätzlich fanden sich LP-Zellen, die entweder nur

Desmin- oder nur Vimentin-positiv waren (Davidoff *et al.*, 1990). Vor allem die äußeren beiden Schichten der LP zeichnen sich durch Vimentin-positive Zellen aus. Die Gruppe um Holstein (*et al.* 1996) nahm an, dass diese beiden Schichten der LP reine Fibroblasten sein könnten, da diese keine Charakteristika für glatte Muskelzell-Antigene aufwiesen.

Peritubuläre Zellen sind in der Lage verschiedene Faktoren zu exprimieren, die für Kontraktilität von Bedeutung sind. Darunter sind Proteine wie Pan-Aktin, Gelsolin, Myosin-heavy-chain 11 (Myh11), Smooth-muscle-actin (SMA), Desmin und Calponin (Albrecht, 2009; Holstein *et al.*, 1996). Aber auch extrazelluläre Matrix-Komponenten, die typischerweise von Bindegewebszellen exprimiert werden, wie Laminin, Fibronectin, Vimentin, Kollagen Typ I und IV, CD90/Thy-1, CD34 (Albrecht, 2009; Davidoff *et al.*, 1990; Dobashi *et al.*, 2003; Gulkesen *et al.*, 2002; Hadley *et al.*, 1987; Haider *et al.*, 1999; Santamaria *et al.*, 1990) und kleine Proteoglykane, Biglykane und Decorin (Adam *et al.*, 2012; Ungefroren *et al.*, 1995) kommen in der LP vor. Zudem können peritubuläre Zellen weitere Substanzen, wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren [transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like-growth-factor-I (IGF-I), peritubular-cell-factor-that-modulates-sertoli-cell-function (PmodS) und Aktivin-A] sezernieren, die unter anderem einen Einfluss auf Sertoli-Zellen ausüben können (Albrecht *et al.*, 2006; Gnessi *et al.*, 1997).

Neben der Funktion als partielle Permeabilitätsbarriere (Maekawa *et al.*, 1996; Rebourcet *et al.*, 2014) zeichnen sich LP-Zellen vor allem durch kontraktile Eigenschaften aus. Die peritubulären Zellen generieren spontane Kontraktionen um Spermien während der Spermiatio ins Lumen zu entlassen und den weiteren Transport durch das Tubulusinnere in Richtung Rete testis zu gewährleisten (Albrecht, 2009; Holstein *et al.*, 1996). Schon während der ersten morphologischen Beschreibungen der Myofibroblasten konnte beobachtet werden, dass diese speziellen Zellen zu Kontraktionen nach Inkubation einer ATP-haltigen Lösung befähigt sind (Bock *et al.*, 1972).

Kontraktionen können durch verschiedene agonistische Substanzen wie Endothelin-1, Vasopressin, platelet-derived-growth-factor (PDGF), Oxytozin, Oxytozin-ähnliche

Substanzen, Prostaglandine, androgene Steroidhormone und Angiotensin II ausgelöst werden (Harris *et al.*, 1998; Mewe *et al.*, 2007; Santiemma *et al.*, 1996; Tripiciano *et al.*, 1999; Tung *et al.*, 1991). Diese Substanzen können auch Effekte auf parakriner, endokriner und autokriner Ebene bewirken (Rossi *et al.*, 2002). Die Gruppe von Zhang (*et al.* 2006) zeigten bei einem Knockout (KO) des AR in peritubulären Zellen (PTM-ARKO), dass Gene die für Kontraktilität (Endothelin-1, Endothelin-Rezeptor A und B, Adrenomullin-Rezeptor und Vasopressin-Rezeptor-1a) maßgeblich von Bedeutung sind, negativ reguliert werden. Dies führt bei Mäusen zur Reduktion der Keimzellzahl und Oligozoospermie und kann darüber hinaus zu Infertilität führen. Ein Fehlen des AR in peritubulären Zellen hat negative Einflüsse auf die normale Entwicklung, Struktur und Funktion der Leydigzellen zur Folge. Es erfolgte eine Down-Regulation Leydigzell-spezifischer Gene [steroidgenic-factor 1 (Nr5a1), IGF-I, Insulin-like factor 3 (INSL3), (Welsh *et al.*, 2012; Welsh *et al.*, 2009)].

Die funktionelle Regulation der peritubulären, kontraktionsfähigen Zellen ist bisher nur unzureichend geklärt. Die physiologische Konsequenz bei struktureller Veränderung, z.B. Verdickung der LP bei Spermatogenesestörungen, und die daraus resultierenden Effekte auf Kontraktilität der Tubuluswand müssen noch weitestgehend untersucht werden.

#### 1.1.5 Keimzelldefekte

Störungen der Spermatogenese können vielfältig vorkommen und führen oftmals zu Sub- und Infertilität. Laut World Health Organisation (WHO (2000) können bei kinderlosen Paaren gleichermaßen Frauen (20%) als auch Männer (25%) betroffen sein. Viele Fälle (30-50%) verbleiben allerdings ätiologisch unbekannt. Männliche Infertilität kann vielfältige Gründe haben: Erkrankungen des Hodens und der ableitenden Gänge, systemische Krankheiten, Toxine und Umweltfaktoren, genetische Faktoren, das Alter u.a. können negative Auswirkungen auf die Fertilität ausüben. In einem großen Teil männlicher Infertilität sind die Ursachen allerdings unklar.

Defekte der Keimzellen können dabei in jedem Stadium auftreten. Schon während der Meiose kann es aufgrund von Nicht-Verpaarung und Fehlverteilung von Chromosomen



zur Bildung von Megalospermatozyten (Holstein *et al.*, 1986; Johannisson *et al.*, 2003) und zu Infertilität bei Patienten mit nichtobstruktiver Azoospermie (NOA) führen (Guichaoua *et al.*, 2005). Häufig kommt es auch bei einer Dedifferenzierung von Sertoli-Zellen zu Spermatogenesedefekten (Bruning *et al.*, 1993). Eine dauerhafte Expression von AMH kann ebenso zu Funktionsstörungen der Sertoli-Zellen und dadurch zu Keimzelldefekten führen (Brehm *et al.*, 2006; Sharpe *et al.*, 2003). Bei Hypospermatogenese ist die Spermatogenese zwar quantitativ reduziert, aber qualitativ intakt. In Fällen von Spermatogenese-Arrest verbleibt die Spermatogenese auf der Stufe der Spermatogonien, der primären Spermatozyten oder der frühen runden Spermatiden. Dies kann entweder alle Tubuli seminiferi oder nur einen Teil betreffen (Kohn *et al.*, 2005); Bergmann *et al.* 2006). Azoospermie (Fehlen von Spermatozoen im Ejakulat) kann bei einem kompletten Spermatogenese-Arrest auftreten. Bei einem vollständigen Fehlen von Keimzellen füllen die Sertoli-Zellen als einzige Zellform das Tubulusinnere aus. Man spricht dann von einem Sertoli-cell-only-Syndrom (SCO-Syndrom). Dieses Phänomen kann fokal oder total auftreten. Oft tritt bei diesem Defekt und generellen Keimzellstörungen eine Verdickung der LP auf. Bei Azoospermie können durchaus invasive Eingriffe zur Gewinnung von testikulären Spermien führen. Die testikuläre Spermienextraktion (TESE) kann nicht nur therapeutisch, sondern auch diagnostisch genutzt werden. Bei größeren invasiven Eingriffen können Hodenbiopsien zur Beurteilung und Klassifizierung der Spermatogenese dienen. Eine Evaluation der Spermatogenese erfolgt am histologischen Hodenquerschnitt nach dem Zustand von Spermatogonien, Spermatozyten, runden und elongierten Spermatiden sowie Sertoli-Zellen. Auch die Morphologie der LP und die Zusammensetzung des Interstitiums fließt in die Beurteilung ein. Eine normale Spermatogenese liegt vor, wenn das Keimepithel die definierten 6 Stadien der Spermatogenese repräsentiert (Clermont, 1972).

#### 1.1.6 Verdickung der Lamina propria

Männliche Infertilität wird vorwiegend mit gestörter Spermatogenese assoziiert. In den meisten Fällen ist dies mit einer Verdickung der LP verbunden. Dabei kommt es zu einer vermehrten Anhäufung von Kollagen und anderem extrazellulärem Material in die peritubuläre Schicht der Tubuli seminiferi. Die Verdickung der LP ähnelt Fibrose-Entwicklungen anderer Organe (Lunge, Leber, Niere, Herz); (Darby *et al.*, 2007;

Dempsey *et al.*, 2006; Rosenbloom *et al.*, 2010; Ruppert *et al.*, 2008). Auch im Alter kann es zu Veränderungen der LP-Morphologie kommen. Als Ursache vermuteten Davidoff *et al.* 1990 eine Umbildung von Myofibroblasten zu Fibroblasten in den inneren Schichten der LP. Dabei wurde auch ein Verlust kontraktile Marker in der verdickten LP beobachtet (Arenas *et al.*, 1997), gezeigt an der verminderten Expression von Desmin in Myofibroblasten (Davidoff *et al.*, 1990). Die Vimentin-Immunreaktivität der peritubulären Zellen bleibt allerdings erhalten (Davidoff *et al.*, 1990). Dies suggeriert eine Phänotyp-Veränderung der Myofibroblasten (Skalli *et al.*, 1986) zu Fibroblasten (Holstein *et al.*, 1996). Durch immunhistochemische Untersuchungen in Kombination mit stereologischen Methoden konnten innerhalb unserer Arbeitsgruppe (Volkman *et al.*, 2011) morphologische Veränderungen der LP bei infertilen Männern in spezifische Gruppen eingeteilt werden. Eine reguläre Expression kontraktile Marker [SMA, Myh11, Calponin und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige Proteinkinase I (PKGI)] konnte in allen Tubuli seminiferi von Hodenbiopsien mit gestörter Spermatogenese, selbst mit starken morphologischen Veränderungen, wie dem SCO-Syndrom, bestätigt werden. Allerdings ließ sich kein Hinweis auf eine Dedifferenzierung von Myofibroblasten finden, wie zuvor von Davidoff *et al.* 1990, beschrieben. Daraus ließe sich folgern, dass ein Verlust von Myofibroblasten der Tubuli seminiferi mit verdickter LP nicht auf gestörte Spermatogenese zurückzuführen ist. In testikulären Biopsien, in denen Tubuli mit normaler und gestörter Spermatogenese unmittelbar nebeneinander liegen [„mixed atrophy“ (MA)], konnte die Expression der kontraktile Proteine Myh11, Calponin und PKGI bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein partieller Verlust dieser Proteine beschrieben. Dies wurde mit einer Dedifferenzierung oder Veränderung des zellulären Phänotyps assoziiert (Welter *et al.*, 2013). Allerdings sind diese Zusammenhänge noch nicht ausreichend geklärt.

Das Cytokin TGF- $\beta$ , dessen Expression in peritubulären Zellen nachgewiesen wurde (Holstein *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2005), scheint einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren während der Differenzierung von Fibroblasten in aktivierte Myofibroblasten zu sein (Powell *et al.*, 1999; Tomasek *et al.*, 2002; Volkman *et al.*, 2011).

Fibrotische Veränderungen des Hodengewebes wurden schon in einer Vielzahl von Krankheitsbildern, die mit männlicher Infertilität in Verbindung stehen, beschrieben. Darunter gehören Männer mit Azoo- und Oligozoospermie (Jiang *et al.*, 2013) oder Patienten, die an Kryptorchismus (Mechlin *et al.*, 2014), Varikozele (Martin *et al.*, 1992; Santoro *et al.*, 2000) und Klinefelter-Syndrom (Aksglaede *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 1992) leiden.

Auch Immunzellen, hauptsächlich Mastzellen und Makrophagen, wird eine Bedeutung in Zusammenhang mit Fibrose und männlicher Infertilität zugesprochen (Apa *et al.*, 2002; Hussein *et al.*, 2005; Yamanaka *et al.*, 2000). Mastzellen, die im interstitiellen Raum, aber auch direkt in oder an der LP lokalisiert sein können, sind bei Fibrose in erhöhter Anzahl vorhanden und zeigen Anzeichen von Degranulierung. Sie sekretieren bestimmte Faktoren, wie Histamin, Tryptase und TNF- $\alpha$ , die peritubuläre Zellen der LP beeinflussen können und Zellumbau während des Prozesses der Infertilität fördern können (Albrecht *et al.*, 2005a; Albrecht *et al.*, 2005b; Frungieri *et al.*, 2002b; Schell *et al.*, 2008).

Neben der LP-Verdickung wurde bei Krankheitsbildern mit gestörter Spermatogenese auch über eine Dilatation der Tubuli seminiferi berichtet (Volkmann *et al.*, 2011). Wann die Dilatation des Lumens auftritt und ob sie Folge einer LP-Störung sein kann, ist bisher völlig unbekannt. Auch der Einfluss der Dilatation der Tubuli auf den Spermientransport ist unzureichend geklärt.

#### 1.1.7 Charakteristika der Lamina propria der Ratte

Im Gegensatz zum Menschen besteht die LP bei der Ratte nur aus einer Schicht ineinander greifender peritubulärer Zellen („Myoidzellen“), die in extrazellulärer Matrix eingelagert sind. Die peritubulären Zellen liegen einer Basallamina an und bilden so die Begrenzung des Keimepithels zum Interstitium.

Auch in der Ratte wurden fibrotische Veränderungen der LP mit gleichzeitiger Verminderung der Spermatogenese beobachtet. Experimentell wurde z.B. von Santamaria (*et al.* 1995) durch Adrenalin eine Hodenatrophie im Ratten-Modell

ausgelöst, die zu einer Verkleinerung des Hodenvolumens, fibrotischer Veränderung der LP und Beeinträchtigung der Keimzellen führte. Im Vergleich zu den Kontroll-Tieren wurde immunhistochemisch eine Zunahme von Kollagen IV, Vimentin, Laminin und Fibronectin festgestellt, während bei Desmin eine Abnahme in der LP zu beobachten war. Dies führte zu der Annahme, dass es zu einer Schädigung der peritubulären Zellen, während der Sekretion extrazellulärer Matrixproteine kommt.

Ratten, die einer Begasung von Ozon ausgesetzt wurden, waren charakterisiert durch eine reduzierte Spermatogenese, eine Hyalinisierung des interstitiellen Gewebes und eine Verdickung der Basallamina und LP. Durch die Zugabe von Vitamin E und C und erneuter Aussetzung mit Ozon konnte der degenerative Effekt gemildert und die Rückbildung der Keimzellen und LP gefördert werden (Jedlinska-Krakowska *et al.*, 2006). Angiotensin II bewirkt eine Regulation intratestikulärer parakriner und autokriner Funktionen um fibrotische Prozesse nach einer Vasektomie einzuschränken (Shiraishi *et al.*, 2003). Die antineoplastischen Cytostatika Cyclophosphamid und Cisplatin rufen im Rattenmodell Oligo- und Azoospermie, gestörte Gonadotropin-Sekretion, Verminderung des Testeron-Levels, sowie eine Verdickung der LP hervor (Ilbey *et al.*, 2009).

#### 1.1.8 Isolierte Lamina propria- Zellen von Mensch und Ratte

Die Möglichkeit, Untersuchungen an menschlichen peritubulären Zellen durchzuführen, sind limitiert. Allerdings existieren schon seit Längerem detaillierte Studien von kultivierten peritubulären Zellen in Kombination mit anderen hodentypischen Zellen in der Ratte. Im Tiermodell konnte man eindeutig einen Einfluss von peritubulären Zellen auf die Spermatogenese nachweisen (El Ramy *et al.*, 2005; Mackay *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 1991; Welsh *et al.*, 2012; Welsh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006b). Sertoli-Zellen stehen über die Basallamina in direktem Kontakt mit den Myofibroblasten der LP (Russell *et al.*, 1983). Durch Co-Kultur-Versuche dieser beiden Zelltypen konnte belegt werden, dass unter der Kontrolle von Androgenen die Bildung von ABP und Transferrin in Sertoli-Zellen erhöht wird (Skinner *et al.*, 1985a). Diese Substanzen sind in den Prozess der Aufrechterhaltung der Blut-Hoden-Schranke und der Abgabe der Spermatozoen in das Lumen involviert (Skinner *et al.*, 1985b; Yan *et al.*, 2008). Peritubuläre Zellen der Ratte zeigen eine konstante polygonale Form während der

Kultivierung. In Monokultur sezernieren sie Fibronectin, Kollagen I und IV in das umgebende Medium. Sertoli-Zellen setzen ebenfalls Kollagen IV frei, aber sind nicht in der Lage eigenständig Kollagen I und Fibronectin zu bilden. Immunhistochemische Analysen konnten darüber hinaus zeigen, dass peritubuläre Zellen Laminin-negativ sind (Skinner *et al.*, 1985b).

Erfolgreiche Kontraktionsstudien von peritubulären Zellen der Ratte (Tung *et al.*, 1991) und des Menschen in einem dreidimensionalen Kollagengel-System (Schell *et al.*, 2010) konnten in Kultur nachgewiesen werden.

Da in vivo Untersuchungen humaner peritubulären Zellen nicht möglich sind, ist man dazu übergegangen ein adäquates humanes Zellmodell zu etablieren, um in objektiver Art und Weise Signalvorgänge, Genexpression und Vorgänge im Zusammenhang mit Fibrose besser untersuchen zu können. Die ersten Untersuchungen an isolierten humanen peritubulären Zellen führte die Gruppe von (Cigorrage *et al.*, 1994) durch Tubuli seminiferi-Explantate wurden präpubertären Patienten mit Androgenresistenz entnommen, um parakrine Wirkungen von verschiedenen Hodenzellen und den Einfluss von Steroidhormonen auf peritubuläre Zellen besser charakterisieren zu können. Die auswachsenden Zellen wurden als elongierte Fibroblasten-ähnliche Zellen beschrieben, die immunpositiv auf SMA reagierten.

Humane peritubuläre Zellen können mittlerweile standardisiert aus menschlichen Hodenbiopsien unterschiedlichen pathogenen Ursprungs gewonnen werden (Albrecht *et al.*, 2006). Das Problem ist aber der begrenzte Zugriff auf gesundes Hodengewebe, um eindeutige Vergleiche zwischen pathologisch unverändertem Material und fibrotisch verändertem Gewebe in Kultur ziehen zu können. Bisher existieren relativ wenige Studien von peritubulären Zellen des Menschen. Dennoch stellt das Zellmodell kultivierter LP-Zellen eine interessante Möglichkeit dar, um peritubuläre Zellen im Detail zu charakterisieren und möglicherweise pathologisch relevante Mechanismen zu identifizieren. Albrecht *et al.* veröffentlichten 2006 Studien über humane peritubuläre Zellen in Kultur. Die Zellen zeigten in Kultur nicht nur eine elongierte Zellform, sondern auch eine Fibroblast- und Muskelzell-ähnliche Morphologie, die die Autoren an Myofibroblasten erinnerten. Sie konnten zudem die Expression einiger Gene, die für

extrazelluläre Matrixproteine kodieren, nachweisen. Darunter waren Kollagen I, IV und XVIII, Fibronectin, Laminin und Osteonectin [secreted-protein-acidic-and-rich-in-cysteine (SPARC)]. Die Gruppe war vor allem an parakrinen Effekten, die durch Mastzellen ausgelöst werden, interessiert. Wie zuvor schon kurz angedeutet, werden Mastzellen unter dem Aspekt von unphysiologischer Zellproliferation und Anhäufung extrazellulärer Matrix im Zusammenhang mit fibrotischen Veränderungen im Hoden vermehrt gefunden (Punkt 1.1.6). Mittels RT-PCR ließen sich die Rezeptoren für Tryptase und Histamin1 nachweisen. In nachfolgenden Studien konnten andere Proteine, wie der Nervenwachstumsfaktor (NGF) und andere Cytokine des Immunsystems [monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) und inflammatorische Moleküle z.B. Interleukin 6 (IL-6)] nachgewiesen werden. Die Expression und Sekretion dieser Proteine wird unter anderem durch den Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) reguliert, der eine Rolle bei Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt und die Aktivität verschiedener Immunzellen anregt. Die Gruppe um Mayerhofer postulierte, dass Mastzell-Produkte (Histamine, Tryptase, TNF- $\alpha$ ) einen Einfluss auf peritubuläre Zellen haben könnten und involviert sind bei Prozessen, welche Sub/Infertilität auslösen können (Frungieri *et al.*, 2002; Frungieri *et al.*, 2002a; Albrecht *et al.* 2005; Schell *et al.*, 2008). Interessanterweise induzierte ein Endprodukt des Prostaglandin-Metabolismus, 15-Deoxyprostaglandin J2 (15dPGJ2), die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) in isolierten peritubulären Zellen, was zu einem reversiblen „Phänotyp-Switch“ führte. Die Zellen würden daraufhin eine verminderte Expression verschiedener Muskelzellmarker (SMA, Calponin und Myh11) zeigen was zu einer Einschränkung der Kontraktionsfähigkeit der Zellen im Kollagengel-Assay führte (Welter *et al.*, 2013).

Das Zellmodell kultivierter LP-Zellen bietet die Möglichkeit, ein besseres Verständnis über die Funktion der bisher unzureichend charakterisierten peritubulären Zellen zu erhalten. Die detaillierte Analyse von kontraktionsfördernden Signalwegen könnte zum Verständnis fibrotischer Veränderungen der zugrunde liegenden männlichen Infertilität beitragen. Wie zuvor erwähnt, scheinen peritubuläre Zellen sich in Kultur durch externe Stimulation phänotypisch zu verändern oder „umzuformen“ (Schell *et al.*, 2010). Allerdings ist dieser sogenannte „Phänotyp-Switch“ von Myofibroblasten weder in vivo

noch in vitro vollständig bewiesen worden. Das vorliegende Zellmodell könnte einen Teil zur Aufklärung leisten.

Bisher wurde das Verhalten von peritubulären Zellen über mehrere Passagen noch nicht gezeigt. Zudem wurde der Phänotyp isolierter peritubulärer Zellen nicht durch Doppelmarkierung von Bindegewebs- und Muskelzellmarker gleichzeitig nachgewiesen. Dies wurde im Laufe diese Doktorarbeit ergänzt.

## 1.2 Aufbau des Nebenhodens

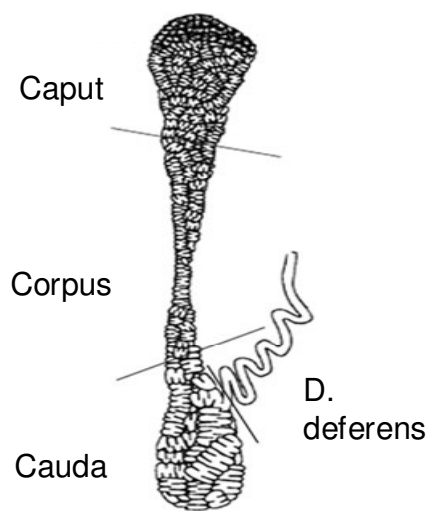
Der NH ist für den Reifungsprozess und die Speicherung der Spermatozoen unentbehrlich. Auf die Spermienreifung wirkt dabei ein komplexes Zusammenspiel von luminalem Flüssigkeitsstrom, den Sekreten des epididymalen Epithels und dem interstitiellen Gewebe.

Der NH erstreckt sich vom cranialen bis zum caudalen Hodenpol. Das Organ besteht aus den stark aufgeknäulten Ductuli efferentes (8-12 Kanälchen, Länge 10-12cm) und dem NH-Gang (Ductus epididymis), welcher in den Samenleiter (Ductus deferens; 35-40cm) übergeht. Eine dünne Bindegewebshülle (Tunica albuginea) bietet dem NH Schutz. Der NH-Gang ist eingebettet zwischen Bindegewebe, das von Nerven, Gefäßen und Lymphbahnen durchzogen wird. Der NH kann makroskopisch in drei strukturell und funktionell unterscheidbare Abschnitte eingeteilt werden (Abb. 3): NH-Kopf (Caput), NH-Körper (Corpus) und NH-Schwanz (Cauda). Im Caput sind sowohl Ductuli efferentes als auch der Beginn des D. epididymidis zu finden. Eine Muskelschicht umgibt das komplette Gangsystem und ist peristaltisch aktiv, sodass der Transport der Spermatozoen zur Cauda gewährleistet ist.

Der NH-Gang ist ca. 6m lang und bildet Schlaufen, sodass er stark aufgeknäult in den 4-5cm langen NH des Menschen passt (Turner *et al.*, 1978). Im Lumen befinden sich neben Spermatozoen auch unreife, vorzeitig entlassene Keimzellen, abgestoßene Epithelzellen, Makrophagen (Spermatophagen) und Flüssigkeit aus Hoden und Rete

testis. Der Lumen-Durchmesser und auch die Dicke der Muskelschicht des D. epididymidis nehmen von proximal nach distal stetig zu, während die Epithelhöhe zur Cauda hin abnimmt. Reife Spermien werden vor allem im Cauda-Bereich gespeichert.

Die morphologische und funktionelle Integrität des NH werden durch verschiedene Hormone (Androgene, Östrogene, Progesteron, Melatonin usw.) und Proteine, wie z.B. Wachstumsfaktoren, aufrecht erhalten (Robaire *et al.*, 2011). Optimale Temperatur und eine autonome Innervation (Ricker, 1998) spielen ebenfalls eine Rolle.



**Abb. 3: Schema eines Ratten-Nebenhodens**, verändert nach (Guo *et al.*, 2007). Die Einteilung des NH erfolgte in Caput, Corpus und Cauda.

#### 1.2.1 Allgemeiner Aufbau des Epithels

Das NH-Epithel besteht aus unterschiedlichen Zellen mit verschiedenen Höhen. Dabei können Schwankungen zwischen 30 und 80µm auftreten.

Das Epithel der Ductuli efferentes besteht aus abwechselnd kubisch, einschichtigem oder mehrreihig prismatischem Epithel. Im histologischen Querschnitt erscheint daher das Epithel wellenförmig. Mikrovilli besetzen die niederen Epithelschichten und sind sekretorisch und resorptiv tätig. Kinozilien sind auf den höheren Epithelabschnitten zu finden, die durch Bewegung einen Flüssigkeitsstrom verursachen und so für den Transport der Spermatozoen beitragen.



Das Epithel des D. epididymidis besteht aus einer zweireihigen, gleichmäßig hohen Reihe von Zellen. Die Epithelzellen dienen der Vergrößerung der Zelloberfläche und sorgen für Sekretions- und Resorptionsvorgänge. Hohe säulenartige Epithelzellen tragen auf der Oberfläche lange unbewegliche Stereozilien, die sich in das Lumen strecken. Diese bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten, die durch Fimbrin quervernetzt sind und basal  $\alpha$ -Aktin enthalten. Basalzellen liegen basolateral und tragen keine Stereozilien. Neben den Säulen- und Basalzellen des Epithels wurden noch weitere Zelltypen wie „clear cells“, „narrow cells“ und „halo cells“ beschrieben (Robaire *et al.*, 1995; Shum *et al.*, 2008). „Narrow cells“ beinhalten V-ATPasen und sekretieren darüber hinaus Protonen in das Lumen und sorgen so für einen leicht sauren pH (pH6.5), sodass die Spermatozoen unbeweglich bleiben (Säurestarre) (Cornwall, 2009; Kujala *et al.*, 2007; Pietrement *et al.*, 2006). „Clear cells“ sind lysisch aktiv und absorbieren Proteine aus dem Lumen. „Halo cells“ scheinen zusammen mit den Basalzellen für die Immunabwehr verantwortlich zu sein (Cornwall, 2009).

Sekretionsvorgänge des Epithels werden hormonell gesteuert. Die Aktivität von Prostaglandinen und Angiotensin scheint einen Einfluss auf die Spermienreifung zu haben (Cosentino *et al.*, 1986; Leung *et al.*, 1998; Shum *et al.*, 2008). Die Expression beider Angiotensin-Rezeptoren, Typ I und II, konnte in Epithelzellen nachgewiesen werden und ist Testosteron-abhängig (Leung *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2003). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Angiotensin-Rezeptor-Typ II der Basalzellen durch Angiotensin II aus dem Lumen aktiviert und so die NO-Bildung veranlasst. NO diffundiert in die benachbarten „clear cells“ und bewirkt über einen spezifischen Signalweg die Akkumulation von V-ATPase in den Mikrovilli. Das Enzym katalysiert die Protonensekretion ins Lumen. Dies führt zur Aufrechterhaltung des physiologisch sauren pHs im Lumen (Shum *et al.*, 2008). Neben Muskelzellen der NH-Wand können auch Faktoren der Epithelzellen auf Kontraktionsprozesse des NH-Gangs wirken. Ein Verdau von Epithelzellen zeigte ein verändertes Kontraktionsmuster der Gang-umgebenden Muskelzellen (Mewe *et al.*, 2006b; Mewe *et al.*, 2007).

#### 1.2.2. D. epididymidis: Muskelzellschicht und Kontraktilität

Glatte Muskelzellen sind die morphologische Grundlage für die peristaltischen Bewegungen des NH-Gangs. Wie bereits erwähnt, nimmt die Dicke der Muskelschicht

von proximal nach distal zu (Holstein *et al.*, 1969). Die jeweiligen NH-Abschnitte weisen verschiedene Arten glatter Muskelzellen auf, die sich in ihrer Erregbarkeit unterscheiden (Mewe *et al.*, 2006b).

Im Caput-Bereich des NH, in dem sich auch die Ductuli efferentes befinden, umgeben nur wenige Schichten glatter Muskelzellen zirkulär die NH-Kanälchen. Sie werden als weniger differenziert angesehen und neigen zu Spontankontraktilität. Durch Oxytocin kann die Autokontraktilität gefördert werden (Veeramachaneni *et al.*, 1990). Die Spermatozoen werden in den Ductuli efferentes nicht nur durch alleinige Muskelkontraktion der Wand transportiert, sondern auch durch die aktive Bewegung der Kinozilien, die ins Lumen ragen (Risley *et al.*, 1958; Heiniger *et al.*, 1996). Es konnte sogar gezeigt werden, dass selbst bei kastrierten Tieren oder während klinischer Eingriffe, in denen die Ductuli efferentes abgebunden wurden, ein epididymaler Transport möglich ist (MacMillan and Auckland. 1960). In derselben Studie konnten mit Röntgen-Untersuchungen Kontraktionen in vivo im proximalen und Corpus-Bereich der Ratte lokalisiert werden. Diese Kontraktionen traten rhythmisch mit einer höheren Frequenz in der proximalen- im Vergleich mit der distalen Region auf.

In den Corpus-Bereich übergehend, wird die Muskelzell-Wand allmählich verstärkt. Im Vergleich zu den Ductuli efferentes hat sich die Anordnung der glatten Muskelzellen jedoch nicht wesentlich verändert. Im bovinen Modell konnten spontane rhythmische Kontraktionen ohne externe Stimuli vom Caput bis zur Cauda dokumentiert werden. Das Kontraktionsprofil ist charakterisiert durch eine Abnahme der spontanen Kontraktionen von proximal nach distal, aber durch einen Anstieg der Amplitude im Cauda-Bereich (Mewe *et al.*, 2006a; Mewe *et al.*, 2006b).

Im D. deferens sind dicke glatte Muskelzellen vorzufinden. Diese werden als ausdifferenziert bezeichnet und haben nur eine geringe Neigung zu spontaner Kontraktilität. Die Kontraktilität der glatten Muskelzellen im D. deferens wird nicht nur von hormonellen und parakrinen Mechanismen reguliert, sondern steht vor allem unter der Kontrolle autonomer Nerven.

Adrenerge und cholinerge Nervenfasern durchziehen das epididymale Interstitium und sind hauptsächlich mit muskulären und vaskulären Strukturen assoziiert. Caput- und Corpusbereich sind spärlich innerviert, während die Muskelschicht der Cauda stark von Nervenfasern durchzogen ist (Kaleczyc *et al.*, 1993; Koslov *et al.*, 2013). In der Cauda finden sich zudem höhere Konzentrationen von Neurotransmittern (Adrenalin und Noradrenalin) als in anderen NH-Bereichen (Eliasson *et al.*, 1968; Mewe *et al.*, 2007). Zudem wurde eine Reihe von Neuropeptiden in Nervenfasern lokalisiert, wie Calcitonin-gene-related peptide (CGRP), Neuropeptid Y (NPY), vasoactive-intestinale-peptid (VIP), Enkephalin und Somatostatin, die zur Regulation des Muskeltonus beitragen (Carvalho *et al.*, 1986; Chevendra *et al.*, 1992; Tainio, 1994; Vaalasti *et al.*, 1986).

Eine starke Innervation des Ductus deferens wird als Hemminnervation aufgefasst, die für eine Ruhigstellung der Spermatozoen sorgt. Nur unmittelbar vor der Ejakulation wird diese Hemmung der Muskelkontraktion aufgegeben.

Studien am NH des Bullen (Mewe *et al.*, 2007) zeigten, dass durch die Zugabe des Neuropeptids Oxytocin im Caput Kontraktionen und in der Region von Corpus und Cauda Relaxation der glatten Muskulatur der Tubuluswand stattfinden. Oxytocin als auch Endothelin-1 wirken in parakriner Weise vasokonstriktorisch auf Muskelzellen (Peri *et al.*, 1998; Filippi *et al.*, 2005). Nach Entfernung des Hodens und dem daraus resultierenden Mangel an Androgenen konnte in einem Tierexperiment der Spermientransport durch zusätzliche Zugabe von Androgenen gesteigert werden. Die Gruppe (Sujarit *et al.*, 1985) postuliert, dass Androgene die Kontraktion im NH positiv beeinflussen könnten.

Neuere Erkenntnisse über zelluläre Mechanismen konnten zum Verständnis der funktionellen Regulation der Muskelschicht des männlichen Reproduktionstraktes beitragen (Mewe *et al.*, 2006a; Mewe *et al.*, 2006b; Mietens *et al.*, 2012; Mietens *et al.*, 2014). Vor allem im Tiermodell, wie Rind, Ratte oder Maus konnten die zellulären Signalwege, die eine Rolle bei Kontraktilität und Relaxation der Muskelzelle spielen, untersucht werden.

Speziesspezifische Unterschiede von Kontraktionsmustern im Hoden und NH wurden bisher spärlich beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe werden momentan Kontraktions-Analysen von Hoden bzw. NH der Ratte und des Menschen im Detail untersucht (Mietens *et al.*, 2014). Ausführliche Untersuchungen über Kontraktionen bei fibrotischen Veränderungen der Muskelschicht und dem daraus resultierende Einfluss auf den Spermientransport im Zusammenhang mit Infertilität im Mann sind bisher unzureichend bekannt.

In einem P2X1-Rezeptor/KO-Mausmodell wurden Störungen der kontraktilen Aktivität im Samenleiter mit daraus resultierender Infertilität beobachtet (Mulryan *et al.*, 2000; White *et al.*, 2013). Ob Störungen des Tubuli seminiferi- oder des D. epididymidis-Kontraktionsmusters auch zu Infertilität führen, ist noch offen.

### 1.2.3 Störungen im Wandaufbau des D. epididymidis

Der korrekte Transport und die Lagerung der Spermatozoen in der Cauda des NH hängen von der kontraktilen Aktivität der Muskelschicht ab. Störungen der NH-Wand und deren Ursache sind bisher relativ unbekannt und unerforscht.

Eine Ursache für Infertilität beim Mann kann ein Verschluss im D. epididymidis sein, sodass keine Spermatozoen im Ejakulat zu finden sind. Die größte klinische Relevanz haben dabei Entzündungen des NH (Epididymitis). Sie können durch bakterielle Harnwegsinfektionen (z.B. Chlamydien, Gonokokken, uropathogene *Escherichia coli*-Stämme, Enterokokken, *Proteus mirabilis*, Klebsiellen und *Pseudomonas aeruginosa*) ausgelöst werden. Ob sie dabei auch Auswirkungen auf die Kontraktilität im NH haben, ist bisher nicht bekannt.

Wandverdickungen im NH sind bislang kaum erwähnt. In klinischen Studien wurden Patienten mit obstruktiver Azoospermie untersucht, wobei eine Verdickung der Muskelschicht des NH-Gangs im proximalen Bereich festgestellt wurde. In der Wand wurden zytoplasmatische Bündel von dünnen Myofilamenten, mikropinozytotisch-aktive Vesikel der Plasmamembran und eine Anhäufung von Kollagen und extrazellulärer Grundsubstanz gefunden (Pelliccione *et al.*, 2004). Die Gruppe

postuliert, dass glatte Muskelzellen im Caput partiell durch Muskelzellen, die einen veränderten Phänotyp, ähnlich dem im Cauda-Bereich aufweisen, ersetzt werden.

Bei einer Lageanomalie des Hodens, z.B. in den Bauchraum (Kryptorchismus), kann auch der NH betroffen sein. Eine alterabhängige Studie in jungen als auch erwachsenen Patienten ergab, dass die Ductuli efferentes und auch der D. epididymidis sichtbar angeschwollen und vergrößert sind. Immunhistochemische und morphometrische Untersuchungen zeigten eine Verminderung der muskulären Schicht um die Gänge in allen drei Regionen, ein reduziertes Lumen und eine verminderte Höhe des Epithels, unabhängig vom Alter (De Miguel *et al.*, 2001).

Ein weiterer Faktor für Infertilität könnten Tumore im NH sein. Hodentumore treten gehäuft bei jungen Männern auf, während bei älteren Männern tumoröse Veränderungen der Prostata dominieren. Bösartige Neoplasien im NH sind sehr selten. Sie machen nur 0.03% der im Mann auftretenden Krebserkrankungen aus (Jones *et al.*, 1997; Ganem *et al.*, 1998; Odrzywolski *et al.*, 2010). Tumore der glatten Muskulatur des NH sind extrem selten. Eine klinische Studie aus China veröffentlichte 2012, dass von 328 Patienten bei denen ein Tumorbefall des NH dokumentiert wurde, ca. 55% eine adenomartige Veränderung des Epithels, 15% Veränderungen der glatten Muskelzellen und 5% tumorartige Veränderungen der Lymph- und Blutgefäße aufwiesen (Yeung *et al.*, 2012).

Warum Entartungen des NH-Gewebes so selten sind und welchen Stellenwert diese und andere Erkrankungen des NH auf die Kontraktilität der Muskelschicht haben, konnte bisher nicht geklärt werden.

#### 1.91 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-System: Kontraktion und Relaxation von glatten Muskelzellen

Glatte Muskulatur, wie sie in Blutgefäßen, Hoden, Magen, Darm, Bronchien usw. vorkommt, enthält Aktin-F-Filamente, Myosin und Intermediärfilamente. Eine Einteilung in Sarkomere, ein tubuläres System oder Myofibrillen, wie sie bei quergestreifter Muskulatur zu finden sind, fehlen hier. Die Regulierung der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur erfolgt über den intrazellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-

Spiegel und die Steuerung verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Membranspannende  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle können sowohl spannungsabhängig durch Depolarisation der Zellmembran als auch durch Bindung eines Liganden (Hormone, Neurotransmitter u.a.) aktiviert werden.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden in glatten Muskelzellen intrazellulär an Calmodulin und nicht an Troponin, welches im Skelett- und Herzmuskel vorkommt. Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird über mehrere Schritte die Aktivierung eines spezifischen Enzyms, Myosin-Leichte-Kette (MLC)-Kinase (MLCK) induziert, welches die Phosphorylierung der MLC katalysiert was zu einer Kontraktion der Muskelzelle führt, während eine Dephosphorylierung der MLC zu einer Relaxation führt (Butler *et al.*, 2013).

Glatte Muskulatur kann aufgrund ihrer Struktur einen lang anhaltenden Tonus aufrechterhalten.

#### 1.3.1 Kontraktion der glatten Muskelzellen

Durch eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels wird eine Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkt. Über Ligandenbindung verschiedener Agonisten, wie Noradrenalin oder Angiotensin II, an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ( $\text{G}_q$  oder  $\text{G}_{11}$ ) wird die Phospholipase C (PLC) an der Innenseite der Membran aktiviert. Dadurch wird eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kontraktion in Gang gesetzt. PLC spaltet hierbei das Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in die Botenstoffe Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ). DAG kann entweder an weitere Zielproteine binden oder weiter hydrolysiert werden, wobei Arachidonsäure entsteht, welches als Boten- oder Ausgangsstoff für andere Prozesse zur Verfügung stehen kann.  $\text{IP}_3$  vermittelt im Cytoplasma über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktivieren die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulinabhängige-MLCK, welche wiederum die Phosphorylierung der regulatorischen leichten (20kD) MLC am Ser-19 des Myosins katalysiert. In Verbindung mit Aktin und Myosin führt dies zum Quer-Brückenschlag mit ATP-Spaltung und eine Verkürzung des Muskels wird initiiert (Perrett *et al.*, 2013; Smrcka *et al.*, 2012). MLC-Phosphatase (MLCP) wiederum spielt eine Rolle im „fine-tuning“ der glatten Muskelzell-Kontraktilität. MLCP dephosphoryliert die MLC und kann dadurch zur Relaxation der Muskelzellen führen (Colson *et al.*, 2012).

Zur Muskelkontraktion kann auch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Weg über die Stimulierung des kleinen G-Proteins RhoA, welches sein Target-Protein Rho-Kinase aktiviert, führen. Die Rho-Kinase wiederum ist in der Lage MLCP zu phosphorylieren und dadurch dessen Aktivität zu inhibieren. Daraufhin kann eine Kontraktion des glatten Muskels ausgelöst werden, ohne dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verändert wird („Kalzium-Sensitisierung“; (de Godoy *et al.*, 2011).

### 1.3.2 cGMP-Signalweg und dessen Einfluss auf die Relaxation glatter Muskelzellen

Das zyklische Nukleotid 3'-5'-cGMP ist ein wichtiges Signalmolekül physiologischer Prozesse und ist in die Modulation der glatten Muskelzell-Relaxation involviert. Dadurch wird z.B. die funktionelle Aktivität des NH-Gangs und des Samenleiters hinsichtlich des Samentransports reguliert (Mewe *et al.*, 2006a). Die Bildung des intrazellulären „second messenger“-Moleküls wird durch spezifische Enzyme katalysiert. Guanylylcyclasen (GC) sind die Schlüsselenzyme im cGMP-vermittelten Signalweg (Takimoto, 2012).

Zum einen kann cGMP über die lösliche Guanylylcyclase (sGC), welche cytosolisch in der Zelle vorliegt und aus zwei Unterformen  $\alpha$  und  $\beta$  ( $\alpha 1/\alpha 2$  und  $\beta 1/\beta 2$ ) besteht, gebildet werden (Koesling *et al.*, 1991). Eine hohe sGC-Expression wurde für Lunge (Weissmann *et al.*, 2014) und Gehirn beschrieben (Zhihui, 2013). Im männlichen Reproduktionstrakt konnte sGC in glatten Muskelzellen der Tunica albuginea, Leydigzellen, testikulären Blutgefäßen, der peritubulären LP, Sertoli-Zellen, Harnblase und auch schwach in Keimzellen nachgewiesen worden (Davidoff *et al.*, 1997; Middendorff *et al.*, 1996; Middendorff *et al.*, 1997a; Middendorff *et al.*, 2002; Andric *et al.*, 2007). Darüber hinaus war eine Lokalisierung auch in der Muskelschicht des NH möglich (Mewe *et al.*, 2006a; Müller *et al.*, 2011). sGC wird durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert. NO, welches zunächst als Endothelium-derived-relaxing-factor identifiziert wurde (Furchgott *et al.*, 1980; Ignarro *et al.*, 1987), hat eine sehr geringe Halbwertszeit und wird in unmittelbarer Umgebung zum Wirkort durch spezifische NO-Synthasen (NOS) hergestellt. Diese katalysieren die Umwandlung von L-Arginin, molekularem Sauerstoff und NADPH zu NO und dem Co-Produkt Citrullin. Drei

Isoformen der NOS sind bekannt: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS) (Forstermann *et al.*, 1994). Die eNOS, welche zuerst im Endothel entdeckt wurde und nNOS, welche in neuronalem Gewebe und Skelettmuskel beschrieben wurde, werden beide konstitutiv gebildet und sind  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig. iNOS ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig auf transkriptioneller Ebene induzierbar und wird in Makrophagen und Mikrogliazellen exprimiert.

NOS-Aktivität konnte in Organen des männlichen Reproduktionstrakts nachgewiesen werden (Ehren *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2008). Im Hoden sind als nNOS-Produktionsorte neben Blutgefäßen, Leydig- und Sertoli-Zellen auch die peritubuläre LP beschrieben worden (Davidoff *et al.*, 1997; Davidoff *et al.*, 1995; Middendorff *et al.*, 1997b). Zusätzlich wurde NOS-Aktivität in allen Regionen des NH (besonders hohe Aktivität in der Cauda) und des Samenleiters dokumentiert (Burnett *et al.*, 1995). Im Rind wurde eNOS in kontraktilen Zellen der Muskelschicht des NH-Gangs nachgewiesen (Mewe *et al.*, 2006a). Ein inhibitorischer Effekt von NO auf die Sekretion von Testosteron in Leydigzellen der Ratte ist bekannt (Adams *et al.*, 1994; Welch *et al.*, 1995).

Neben NO kann auch Kohlenstoffmonoxid (CO) sGC-Aktivierung induzieren. In Sertoli-Zellen wurde das CO-produzierende Enzym Hämoxxygenase-1 nachgewiesen (Middendorff *et al.*, 2000b).

Nicht nur über NO und sGC ist ein Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels möglich. cGMP-Bildung kann außerdem über die Katalyse von Guanosintriphosphat (GTP) über membranständige GCs erfolgen. In Säugetieren wurden sieben Gene identifiziert, die für membrangebundene GCs (GC-A bis GC-G) kodieren. Untereinander weisen die Enzyme eine ähnliche Topologie auf. Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindenden Domäne, einer kurzen Transmembran-durchziehenden Region und einer intrazellulären Domäne, die eine katalytische Region für GC enthält. Zwei der membrangebundenen GCs (GC-A, GC-B) stellen Rezeptoren der sogenannten natriuretischen Peptide dar (Potter, 2011a; Potter, 2011b; Saito *et al.*, 2011).

Der Rezeptor GC-A wird durch die Herz hormone atriales natriuretische Peptid (ANP) und das zuerst im Gehirn entdeckte „brain“ natriuretische Peptid (BNP) aktiviert. ANP



zeigt dabei eine höhere Affinität zu GC-A als BNP. GC-A-Expression wurde in Gefäßmuskelzellen, in Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems, Niere, Milz, Herz, und weiteren Organen nachgewiesen (Lowe *et al.*, 1989; Pandey, 2011). GC-B dient als spezifischer Rezeptor für das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). GC-B-Expression wurde vor allem in Chondrocyten, Fibroblasten der Lunge, Gefäßmuskelzellen, Uterus, Gehirn und der Niere dokumentiert (Potter *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 1989). Dessen Substrat CNP wird hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen gebildet und wirkt als autokriner und parakriner Regulator des Gefäßtonus und des Zellwachstums über die Bindung an GC-B (Schulz, 2005; Sellitti *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2012). Aber auch Knochenstrukturen sind Expressionsorte von CNP (Miura *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2013). CNP<sup>-/-</sup> und GC-B<sup>-/-</sup>-KO-Mäuse weisen einen zwergerartigen Phänotyp und ein erhöhtes Körpergewicht auf. Weibliche Mäuse sind steril (Fujii *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2007). Auch im Menschen führen Mutationen des GC-B-Rezeptors zu Zwergenwüchsigkeit (Khan *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2013; Yasoda *et al.*, 2010). GC-A<sup>-/-</sup>, ANP<sup>-/-</sup> und BNP<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten schwere physiologische Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie, Störungen der Bauchspeicheldrüse und fibrotische Veränderungen am Herzen (Klaiber *et al.*, 2010; Ropero *et al.*, 2010; Kuhn, 2003).

Die natriuretischen Peptide können aber auch an einen dritten Rezeptor (Clearance-Rezeptor, NPR-C) binden, der keine GC-Aktivität besitzt und durch Internalisierung der natriuretischen Peptide zu deren Abbau beiträgt.

GC-A und GC-B werden in Teilen des männlichen Reproduktionstrakts, wie Penis (Müller *et al.*, 2010), Hoden und NH und nur in geringem Maße in der Prostata exprimiert (Müller *et al.*, 2011). GC-A ist dominant in den Keimzellen der Tubuli seminiferi zu finden und mit Beginn der Pubertät hochreguliert. Demgegenüber nimmt die Expression des interstitiell lokalisierten Clearance Rezeptors NPRCs mit Beginn der Pubertät stark ab (Middendorff *et al.*, 2000a; Müller *et al.*, 2004). GC-B konnte in der peritubulären LP, der hodenumgebenden Tunica albuginea und in testikulären Blutgefäßen nachgewiesen werden (Middendorff *et al.*, 2000a). Der GC-B Ligand CNP wurde in Leydigzellen nachgewiesen (Middendorff *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigten sich Leydigzellen nicht nur als Expressionsort für sGC, sondern auch für GC-A und CC-B was eine Beeinflussung auf die Testosteron-Produktion schließen lässt

(Mukhopadhyay *et al.*, 1986; Middendorff *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 2006).

Zusätzlich konnten alle zuvor beschriebenen Rezeptortypen in der Muskulatur des NH lokalisiert werden (Kim *et al.*, 2000; Mewe *et al.*, 2006a; Mietens *et al.*, 2014). Kontraktionsstudien wurde an isolierten Abschnitten des NH-Ganges von Ratte und Rind durchgeführt. Eine Veränderung des Kontraktionsmusters durch Zugabe verschiedener Komponenten des cGMP-Systems wurden dokumentiert (Mewe *et al.*, 2006a; Mietens *et al.*, 2012; Mietens *et al.*, 2014).

Die genaue Verteilung der Rezeptoren in Teilen des NH (Caput, Corpus, Cauda) in Ratte und Mensch ist noch nicht eindeutig geklärt.

Das Signalmolekül cGMP vermittelt verschiedene Zellantworten und ist in der Lage verschiedene Effektoren und Zielstrukturen zu aktivieren. Es spielt in der Regulation der Relaxation eine entscheidende Rolle. Dabei wird eine Signalkaskade über das von cGMP aktivierte Enzym cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG) initiiert. Weitere Target-Proteine von cGMP sind cGMP-regulierte Ionenkanäle [cyclic-nucleotide-gated-cation-channels (CNG)]; (Weyand *et al.*, 1994; Wiesner *et al.*, 1998) und die Phosphodiesterasen (PDEs). Die cGMP-Spiegel variieren je nach zellulärem Kompartiment, sodass man davon ausgehen kann, dass eine Ansammlung von cGMP-„Pools/Wolken“ in der Zelle existiert und es zur Bildung von sogenannten Mikrodomänen kommt (Francis *et al.*, 2010).

PKG gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Bisher konnten in Säugetieren zwei Gene, die für die Proteine PKGI und II kodieren, identifiziert werden. Durch alternatives Splicing wurden die Exons des N-Terminus von PKGI so verändert, dass daraus zwei unterschiedliche Isoformen, PKGI $\alpha$  und PKGI $\beta$ , entstanden sind. Die Unterscheidung der beiden Isoformen erfolgt nach ihrer Enzymaktivität und der Substratspezifität (Hofmann *et al.*, 2000). PKGI ist ein Homodimer und besteht aus drei funktionell verschiedenen Domänen: einer katalytischen, einer N-terminalen und einer

regulatorischen Domäne (Pfeifer *et al.*, 1999). cGMP ist in der Lage allosterisch an zwei hintereinander geschaltete cGMP-Bindungsstellen der regulatorischen Domäne der PKGI zu binden. PKGI kommt in hohen Konzentrationen in glatten Muskelzellen, Thrombozyten, verschiedenen Arealen des Gehirns (Cerebellum, Hippocampus), der neuromuskulären Endplatte, Harnblase, Lunge und den Herzmuskelzellen vor (Hofmann *et al.*, 2000). In geringeren Konzentrationen ist die PKGI in Granulozyten, Chondrozyten und Osteoklasten exprimiert. Im Reproduktionstrakt wurde PKGI in Myofibroblasten der LP, in testikulären Blutgefäßen, in der Harnblase, im Penis, in der Muskelschicht des NH-Ganges und in geringen Konzentrationen in der Prostata nachgewiesen (Holstein *et al.*, 1996; Mewe *et al.*, 2006a; Müller *et al.*, 2011; Volkmann *et al.*, 2011; Welter *et al.*, 2013).

PKGII ist ebenfalls in Teilen des Gehirns zu finden. Daneben konnte eine Expression des Enzyms in Niere, Chondrozyten und Lunge bestätigt werden (Giese *et al.*, 2013; Lohmann *et al.*, 1997).

Im Relaxierungsprozess glatter Muskelzellen spielt PKGI eine maßgebliche Rolle, da das Enzym verschiedene Target-Proteine phosphoryliert und den zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel moduliert.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können entweder aktiv über spezifische Transporter aus der Zelle befördert werden oder es erfolgt die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Sarko/Endoplasmatische Retikulum. PKGI kann direkt die Dephosphorylierung der MLC durch die MLC-Phosphatase auslösen und dadurch eine Relaxation der Muskelzelle bewirken. Darüber hinaus zeigt PKGI eine hohe Affinität zum  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinase-Substrat (IRAG). Durch Phosphorylierung von IRAG wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER gehemmt (Fritsch *et al.*, 2004). PKGI-abhängig kann die PLC gehemmt, und dadurch die Bildung von  $\text{IP}_3$  unterdrückt werden. PKGI phosphoryliert und aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) Kalium-Kanäle, um eine Hyperpolarisation der Plasmamembran auszulösen und dadurch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx zu hemmen (Fukao *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2008).

Kontraktions- und Relaxationsstudien im Nager-Modell und menschlichem Gewebe unter dem Einfluss des cGMP-Signalweges können zu einem besseren Verständnis des Spermientransports im menschlichen Hoden und NH führen und einen Aufschluss

darüber geben, ob tubuläre Kontraktionen tatsächlich einen Effekt auf den luminalen Spermientransport und die Spermiatio ausüben.

### 1.3.3 Rolle der Phosphodiesterasen

PDEs katalysieren die Hydrolyse der Signalmoleküle cAMP und cGMP und sind somit entscheidend für die zeitliche und räumliche Ausbreitung zyklischer Nukleotidsignale (Maurice *et al.*, 2014). Durch ihre subzelluläre Lokalisation und Kompartimentierung in Mikrodomänen sind PDEs in der Lage, an spezifischen Stellen in der Zelle zu wirken (Baillie, 2009; Bender *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2006; Fischmeister *et al.*, 2006). Die PDE-Aktivität wird durch verschiedene Signale, z.B. Hormone, Neurotransmitter, Cytokine, Licht und oxidative Einflüsse gesteuert.

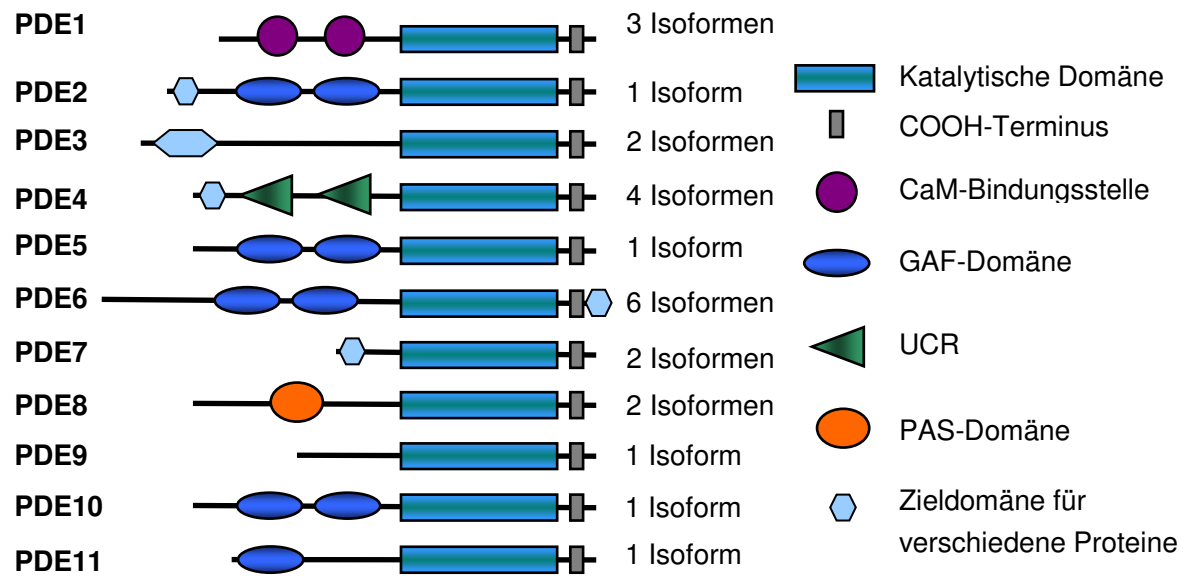
PDEs sind stark mit verschiedenen physiologischen Funktionen im Körper verbunden und können daher ganz spezifisch reguliert und exprimiert sein. Bei pathologischen Zuständen im Körper führen Fehlfunktionen der PDE-Aktivität häufig zu schweren Erkrankungen, wie Asthma, erektile Dysfunktion (ED), chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Autoimmunerkrankungen, pulmonale Hypertonie (PAH), Herzerkrankungen, Schizophrenie, Schlaganfall und Depressionen (Keravis *et al.*, 2012). Deshalb ist die Entwicklung spezifischer PDE-Inhibitoren von großer klinischer Relevanz.

Wie zuvor erwähnt, ist die Rolle der cGMP-hydrolysierenden PDEs von wesentlicher Bedeutung im Zusammenhang mit Relaxation glatter Muskelzellen. Bekanntermaßen wurden bereits einige PDEs im männlichen Reproduktionstrakt beschrieben (Omori *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2011; Keravis *et al.*, 2012; Shimizu-Albergine *et al.*, 2012; Cichero *et al.*, 2013; Heuser *et al.*, 2013). Trotzdem fehlen ausreichende Kenntnisse über Expression, zellspezifische Lokalisation und Funktion der meisten PDEs in Hoden und NH.

#### 1.3.4 Einteilung, Nomenklatur und Aufbau der Phosphodiesterasen

Bisher wurden 21 Genprodukte in Ratte, Maus und Mensch identifiziert, aus denen sich 11 PDE-Familien aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zusammensetzen. Nach der Nomenklatur bezeichnet der Buchstabe die jeweilige Isoform und die nachfolgende Zahl bestimmt die Genvariante der Isoform. Durch die unterschiedlichen transkriptionellen Produkte und alternatives Splicing der mRNA-Vorläufer-Moleküle kann man von mehr als über 100 verschiedenen mRNA-Produkten ausgehen. Die PDE-Familien teilen ca. 35%-50% Sequenzhomologien, wobei nahezu 270 Aminosäuren in der C-terminalen katalytischen Domäne konserviert sind. Durch die Komplexität der PDE-Familien ergibt sich die Frage unterschiedlicher physiologischer Relevanz so vieler Genprodukte und den daraus resultierenden Isoformen. Darüber ist bisher jedoch noch wenig bekannt.

In jedem Zelltyp können mehrere unterschiedliche PDEs exprimiert sein. Ihre Lokalisation innerhalb der Zelle kann variieren. PDEs unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Genprodukte und jeweiligen Isoformen, sondern in der Regulation durch diverse biochemische Mechanismen wie Phosphorylierung/Dephosphorylierung, allosterische Bindung von cGMP und cAMP, Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (CaM)-Komplex und verschiedene Protein-Protein-Interaktionen (Bender *et al.*, 2006). Zudem weisen einige PDE-Gene mehrere Promotoren mit individuellen regulatorischen Merkmalen auf. Es existieren vielfältige alternative mRNA-Splicing-Varianten, die zur molekularen Vielfalt der PDEs beisteuern.



**Abb. 4: Schema der Phosphodiesterasen-Domänen**

PDEs sind gute Zielorte für Medikamente, da sie eine hohe Affinität für ihre Substrate haben (Maurice *et al.*, 2014). Sie können schon in geringer Konzentration cAMP und cGMP abbauen, d.h. ein selektiver Inhibitor muss nicht in hohen Mengen vorhanden sein, um einen kompetitiven Effekt auszulösen. Daher ist es klinisch hochattraktiv ganz selektive Inhibitoren für spezifische Isoformen zu entwickeln ohne Auftreten unerwünschter Nebeneffekte. Der therapeutische und vor allem finanzielle Erfolg von Sildenafil (Viagra), einem selektiven PDE5-Inhibitor, validiert dieses Konzept (Barnett *et al.*, 2006).

Inhibitoren für PDE3 und PDE4 wurden, z.B. gegen Herzerkrankungen (Movsesian, 2000; Kambayashi *et al.* 2007) und COPD eingesetzt.

Neben spezifischen Inhibitoren sind auch unspezifische Inhibitoren, wie 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) bekannt. IBMX hemmt einen Großteil der PDE-Isoformen mit Ausnahme der PDE8A-B (Fisher *et al.*, 1998; Soderling *et al.*, 1998) und PDE9A (Omori *et al.*, 2007).

Tabelle 1: Affinität der PDE-Isoformen gegenüber cAMP und cGMP und Angabe spezifischer PDE-Inhibitoren

PDE-Familie	Km ( $\mu\text{m}$ ) cGMP/cAMP	Inhibitoren
PDE1	0.3–6/0.6–124	Nimodipin, IC86340, IC224, IC295, Dioclein, Vinpocetin, 8-Methoxymethyl-3-Isobutyl-1-Methylxanthin (8MM-IBMX)
PDE2	15/15	EHNA, BAY-60–7750, PDP, IC933, Oxidol, ND7001
PDE3	0.2/0.1	Cilostamid, Milrinon, Siguazodan, Cilostazol, Enoximon, OPC-33540
PDE4	2/>300	Rolipram, Roflumilast, Cilomast, NCS 613, Apremilast, Quinolyl Oxazol, Gsk256066, AWD12-281, DC-TA-46
PDE5	150/1	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil, Aranfil, Udenafil, Mirodenafil
PDE6	2000/60	Zaprinast, DMPPO, Sildenafil, Vardenafil
PDE7	0.2/>1000	BRL 50481, IC242, ASB16165
PDE8	0.06/NA	PF-04957325
PDE9	NA/0.07–0.17	BAY-73–6691, PF-04447943, WYQ-C28L
PDE10	0.02–1/13	Papaverin, TP-10, MP-10. Amgen, Astra Zeneca, Biotie, Omeros
PDE11	0.5–2/0.3–1	Nicht selektiv

Die Daten sind aus folgenden Publikationen entnommen: Bender *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2010; Lugnier, 2006; Maurice *et al.*, 2014. NA-nicht bekannt

Zusätzlich zu biochemischen und pharmakologischen Studien wurden PDE-KO-Mausmodelle erzeugt. Die aus dem KO resultierenden physiologischen Merkmale in Kombination mit funktionellen Studien, unter Einsatz selektiver PDE-Inhibitoren, ermöglichen ein besseres Verständnis über die Funktion von PDEs.

### 1.3.5. Phosphodiesterasen-Genfamilien

#### 1.3.5.1 cGMP-spezifische Phosphodiesterasen

Aufgrund ihrer Substratspezifität können einige PDEs spezifisch cGMP spalten (PDE5, PDE6 und PDE9), andere haben nur eine Spezifität für das Substrat cAMP (PDE4, PDE7 und PDE8) und manche PDEs sind in der Lage sowohl cAMP als auch cGMP dualspezifisch (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11) zu degradieren.

##### 1.3.5.1.1 PDE5

PDE5 weist eine Isoform (PDE5A) mit drei verschiedenen Transkriptvarianten: PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3 auf. Das Enzym ist im Cytosol lokalisiert und beinhaltet zwei „cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA“-Domänen (GAF-A und -B) am N-Terminus der Sequenz. GAF-A ist für die allosterische Bindung von cGMP zuständig. Deshalb wird PDE5 auch cGMP-bindende-cGMP-spezifische PDE genannt. Die GAF-B-Domäne begünstigt die cGMP-Bindung an GAF-A (Francis *et al.*, 2005).

PDE5-Expression wurde in der Lunge, in Muskelzellen von Gefäßen und der Luftröhre (Sanchez *et al.*, 1998), aber auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Shimizu-Albergine *et al.*, 2012), in Epithelzellen des Magen-Darmtrakts (Sopory *et al.*, 2004), in Endothelzellen (Francis *et al.*, 2005), in Melanomzellen (Bazhin *et al.*, 2010) und im Herzen nachgewiesen (Lu *et al.*, 2010). Eine hohe Expression von PDE5 wurde im Corpus cavernosum des Penis beschrieben und die Hemmung der PDE5 durch den selektiven PDE5-Inhibitor Sildenafil (Viagra) erreichte einen finanziellen und medialen Höhepunkt in der erfolgreichen Therapie gegen erektile Dysfunktion. PDE5-Inhibitoren werden aber auch in Verbindung mit anderen Krankheiten (PAH und kardiovaskuläre Erkrankungen u.a.) eingesetzt (Ghofrani *et al.*, 2002a; Ghofrani *et al.*, 2002b; Ghofrani *et al.*, 2003).



#### 1.3.5.1.2 PDE6

In den Stäbchen und Zapfen der Retina wird die Signalkaskade von cGMP reguliert (Wen *et al.*, 2014). Während der Fototransduktion kommt es in den Fotorezeptoren zu einer Änderung des Membranpotentials. Dabei werden spezifische Natriumkanäle durch cGMP gesteuert und das cGMP-Signal wird vorrangig von PDE6 terminiert.

PDE6 besitzt zwei große katalytische Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Die drei Isoformen PDE6A, PDE6B und PDE6C werden durch die katalytische Untereinheit reguliert, während PDE6D, PDE6G und PDE6H durch die inhibitorische Untereinheit reguliert werden. Auch hier sind GAF-Domänen vorhanden. Mutationen in Genen der PDE6 (PDE6 $\alpha\beta$ Gen in Stäbchenzellen der Retina) verursachen eine Erhöhung des cGMP-Spiegels in Fotorezeptoren der Retina (Bowes *et al.*, 1990).

Subtypen der PDE6 wurden auch außerhalb der Retina in der Lunge von Mäusen (Tate *et al.*, 2002) und in vaskulären Gefäßen von Ratten (Murray *et al.*, 2003) nachgewiesen. Erst kürzlich wurden die Isoformen PDE6D, PDE6G und PDE6H in alveolaren Epithelzellen bei Lungenfibrose entdeckt (Nikolova *et al.*, 2010). Diese Studie lässt vermuten, dass PDE6-Isoformen ein therapeutisches Target in der Behandlung von PAH darstellen könnten.

Phänotypisch weisen PDE6-KO-Mäuse ein reduziertes Körpergewicht auf. Die Retina ist normal entwickelt und die Tiere sind zeugungsfähig (Zhang *et al.*, 2014).

#### 1.3.5.1.3 PDE9

PDE9 ist hochaffin gegenüber cGMP. Diese Affinität übertrifft die der anderen PDEs bei weitem. Bisher ist nur eine Isoform (PDE9A) bekannt. PDE9A ist neben PDE8 nicht sensitiv gegenüber IBMX. Im Gegensatz zu PDE5 und 6 enthält PDE9 keine GAF-Domänen. PDE9-Expression wurde in der Niere, Leber, Lunge und auch in Teilen des Gehirns nachgewiesen (Keravis *et al.*, 2012). PDE9<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine reduzierte Insulin-Resistenz, reduziertes Gewicht und einen geringen Fettanteil des Körpers (Deninno *et al.*, 2009). Eine Deletion oder Inhibierung des Gens führt in vivo zu einer Erhöhung von cGMP im zentralen Nervensystem (Menniti *et al.*, 2008).

### 1.3.5.2 Dual-spezifische Phosphodiesterasen (cAMP- und cGMP-degradierende PDEs)

#### 1.3.5.2.1 PDE1

Die PDE1-Familie war eine der ersten Familien dieser Enzymgruppe die beschrieben wurde (Keravis *et al.*, 2010). Sie kommt vorwiegend im Cytosol vor und wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin (CaM) reguliert. Das Enzym hat zwei Bindungsstellen für diesen speziellen Komplex am N-Terminus, der die Hydrolyse-Aktivität stimuliert. Eine katalytische Domäne (C-Domäne) ist am Carboxyl-Ende zu finden. Zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Bindungsstellen liegt eine inhibitorische Sequenz.

Es existieren drei PDE1-Isoformen: PDE1A, 1B und 1C, die normalerweise in verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebes exprimiert sein können. Alle drei Isoformen sind dual-spezifisch, aber die Affinität für das jeweilige Substrat variiert. PDE1A ist hochspezifisch gegenüber cGMP ( $K_m=5\mu\text{M}$ ). Für cAMP beträgt die  $K_m$  nur noch  $112\mu\text{M}$ . PDE1B präferiert cGMP ( $K_m=2,4\mu\text{M}$ ) vor cAMP ( $K_m=24\mu\text{M}$ ) und PDE1C ist in der Lage beide zyklischen Nukleotide mit etwa der gleichen Affinität zu hydrolysieren (Bender *et al.*, 2006). Die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplexes verändert die Konformation des PDE1-Isoenzym und erhöht dadurch die  $V_{\text{Max}}$  für die Hydrolyse zyklischer Nukleotide ohne die  $K_m$  zu verändern. PDE1A1 und PDE1A2 besitzen Phosphorylierungsstellen für PKA, während PDE1B1 von CaM Kinase II phosphoryliert werden kann. Daraufhin kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und daraus resultierend die PDE1-Aktivität sinken (Keravis *et al.*, 2012). Alle drei PDE1-Isoformen kommen im Gehirn, aber in verschiedenen Regionen, vor. Hohe PDE1A-Expression wurde in Niere, Schilddrüse (Lakics *et al.*, 2010) und in Gefäßen beschrieben (Essayan, 2001; Giachini *et al.*, 2011). PDE1B-Expression konnte während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und in Gefäßen nachgewiesen werden (Bender *et al.*, 2005). Hohe PDE1C-Proteinlevel konnten im Herzen, der Harnblase und in der Lunge nachgewiesen werden (Lakics *et al.*, 2010). PDE1C wurde in proliferierenden glatten Gefäßmuskulzellen beschrieben. Es wird vermutet, dass PDE1C eine Rolle bei der Umorganisation von Zellen innerhalb der Gefäße spielt und somit ein mutmaßliches Target z.B. bei der Stenose von Blutgefäßen sein könnte

(Rybalkin *et al.*, 1997). PDE1C2 wurde zudem in sensorischen Riechzellen nachgewiesen. Man nimmt an, dass dieses Isoenzym die Signaldauer von cAMP in Bezug auf Stimulation durch bestimmte Geruchsstoffe reguliert (Yan *et al.*, 1995).

Alle drei PDE1-Isoformen wurden im männlichen Reproduktionstrakt beschrieben. Im Hoden der Maus wurden mRNA und Proteinexpression von PDE1A in elongierten Spermatiden nachgewiesen, während PDE1C-Expression in der meiotischen Prophase und postmeiotischen Stadien nachgewiesen werden konnte. PDE1B-Expression wurde hingegen im Interstitium gezeigt (Yan *et al.*, 2001). Ein Anstieg der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht die Hydrolyseaktivität der drei PDE1-Isoformen in glatten Muskelzellen, sodass cAMP und cGMP vermehrt abgebaut werden (Francis *et al.*, 2010). In einem Hypoxie-Mausmodell wurde eine erhöhte PDE1A-Expression in Gefäß-Muskelzellen festgestellt. Nach chronischer Zugabe eines PDE1-Inhibitors konnte ein reversibler Effekt auf den Lungendruck und die Umgestaltung der kleinen Blutgefäße in der Lunge beobachtet werden (Schermuly *et al.*, 2007).

Eine PDE1A-KO-Maus ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht generiert worden. Aber ein PDE1B-KO-Mausmodell weist phänotypisch eine erhöhte motorische Aktivität auf. Die Tiere sind allerdings im räumlichen Lernen eingeschränkt (Reed *et al.*, 2002; Siuciak *et al.*, 2007). Ein PDE1C<sup>-/-</sup>-Mausmodell zeigte verminderte Sensitivität und Adaption des Geruchssinns (Cygnar *et al.*, 2009). Die Selektivität der bisher bekannten Inhibitoren (Nimodepin, 8MM-IBMX, Dioclein u.a.) ist recht begrenzt.

#### 1.3.5.2.2 PDE2

PDE2 hydrolysiert in gleichem Maße cAMP und cGMP. PDE2 wird allosterisch stimuliert, indem cGMP an eine der GAF-Domänen bindet und so die Konformation des Enzyms ändert. Dadurch wird die Hydrolyseaktivität gesteigert. Ein Gen (pde2a) kodiert für drei mRNA-Varianten: PDE2A1, PDE2A2 und PDE2A3. Sie unterscheiden sich am N-terminalen Ende, was eine unterschiedliche zelluläre Lokalisierung erlaubt. PDE2A1 ist cytosolisch, wohingegen PDE2A2 und PDE2A3 membrangebunden sind. Auch PDE2 gehört zu den PDEs, die zwei GAF-Domänen (GAF-A und -B) besitzen.

cGMP bindet an die GAF-B-Domäne wodurch die cAMP-Hydrolyse stimuliert wird. Diese Funktion erlaubt der PDE2 eine „cross-talk“-Rolle zwischen cAMP und cGMP in der Zelle einzunehmen (Lugnier, 2006).

PDE2-Expression konnte in Gehirn, Herz, Thrombozyten, Endothelzellen, Nebenniere, Makrophagen (Bender *et al.*, 2006) und glatten Muskelzellen (Kass *et al.*, 2007; Genders *et al.*, 2011) nachgewiesen werden.

#### 1.3.5.2.3 PDE3

Die Isoenzyme PDE3A und PDE3B zeigen beide eine gleich hohe Affinität für cAMP und cGMP. cGMP verhält sich als kompetitiver Inhibitor für die Degradation von cAMP an der katalytischen Domäne. PDE3A weist eine PKA-Phosphorylierungsstelle auf, was zur Aktivierung der PDE3A beiträgt und gleichzeitig zu einer negativen Feedback-Regulation von cAMP führt.

PDE3A ist hauptsächlich in Herz (Lugnier *et al.*, 1993), Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. PDE3B hingegen wurde in Adipocyten (Nilsson *et al.*, 2006), Leber (Geoffroy *et al.*, 2001) und auch Spermatozyten gefunden.

PDE3A-KO-Mäuse sind unfruchtbar. Dabei wird PDE3A eine Rolle in der Entwicklung und Reifung von Oozyten im weiblichen Reproduktionstrakt zugesprochen (Masciarelli *et al.*, 2004). In PDE3B<sup>-/-</sup>, aber nicht in PDE3A<sup>-/-</sup>-Mäusen, konnte eine verminderte Kontraktionsfähigkeit des Herzens festgestellt werden (Beca *et al.*, 2013). Eine transgene Maus, welche eine gezielte Überexpression von PDE3B in  $\beta$ -Zellen des Pankreas aufweisen, zeigen zusätzlich eine gestörte Insulin-Produktion (Harndahl *et al.*, 2004).

#### 1.3.5.2.4 PDE10

PDE10 existiert als ein Gen (pde10a) mit einer Isoform (PDE10A), aber diese kommt in 18 Splice-Varianten (PDE10A1-PDE10A18) vor (Xie *et al.*, 2006). Zwei GAF-Domänen befinden sich am N-terminalen Ende der Sequenz, aber im Gegensatz zu anderen PDEs, binden diese GAF-Domänen nur cAMP (Keravis *et al.*, 2012). Die

Hydrolyse von cGMP wird durch cAMP inhibiert (Bender *et al.*, 2006). Hauptsächlich ist das Vorkommen dieser PDE-Isoform im Gehirn und in der Epiphyse beschrieben worden. Aber in geringen Konzentrationen wurde PDE10A auch im Hoden nachgewiesen. PDE10A wird eine Rolle in der Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit zugesprochen (Giorgi *et al.*, 2011).

PDE10A<sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine gestörte Motorik und ein verringertes Fluchtverhalten auf. Weibliche KO-Mäuse dieses Gens weisen eine deutlich verminderte Körpergröße auf (Siuciak *et al.*, 2006). Kürzlich wurde beschrieben, dass PDE10A eine zentrale Rolle im progressiven Gefäßumbau innerhalb der Lunge einnimmt. Dies könnte ein neuer therapeutischer Ansatz für die Behandlung der PAH sein (Tian *et al.*, 2011).

#### 1.3.5.2.5 PDE11

Die PDE11-Familie besitzt eine katalytische Sequenz die größere Ähnlichkeit zu PDE5 als zu PDE10A hat. PDE11 ist im Hoden und in der Prostata vorhanden. Weitere Expressionsorgane sind Hypophyse, Leber und Herz. Bisher sind 4 Transkriptvarianten (PDE11A1-PDE11A4) einer Isoform (PDE11A) bekannt.

PDE11A3 ist eine Variante die speziell nur im Hoden vorkommt (Loughney *et al.*, 2005). PDE11A4 hingegen ist nur in der Prostata zu finden. Bei PDE11A-KO-Mäusen wurde eine verminderte Spermienfunktion und gestörte Spermatogenese beschrieben. Die PDE11A3-Transkriptvariante ist bei diesen Mäusen nicht exprimiert (Wayman *et al.*, 2005). Dieses Mausmodell weist zudem vergrößerte Herzventrikel auf. Zusätzlich wurde ein abnormales Verhalten dieser Mäuse festgestellt (Kelly *et al.*, 2010).

Auch in dieser PDE sind GAF-Domänen zu finden. PDE11A2 und PDE11A3 besitzen eine vollständige und eine unvollständige GAF-Domäne (Omori *et al.*, 2007). In PDE11A4 sind zwei GAF-Domänen und auch eine Phosphorylierungsstelle für PKA und PKG zu finden (Yuasa *et al.*, 2000). Aber die explizite Rolle der GAF-Domäne in PDE11 ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

### 1.3.5.3 cAMP-spezifische Phosphodiesterasen

#### 1.3.5.3.1 PDE4

Von PDE4 sind vier Isoformen bekannt (PDE4A-D). Die PDE4-Familie wird auch cAMP-spezifische Rolipram-sensitive PDE genannt. PDE4 weist eine einzigartige Aminosäure-Signatur auf, die auch „upstream-conserved-region“ (UCR-Domäne) genannt wird (Bolger *et al.*, 1993). Die Expression von PDE4 wurde bisher in Gehirn, glatten Muskelzellen, Herz, Niere, Endothelzellen, Hoden und Immunzellen beschrieben.

Im männlichen Reproduktionstrakt konnten Unterschiede in der Expression und der zellulären Verteilung von PDE4D1 und PDE4D2 in Sertoli-Zellen nach Gabe von FSH beobachtet werden (Levallet *et al.*, 2007). PDE4A<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen auffällig ängstliches Verhalten, sodass PDE4A als neues Target für therapeutische Maßnahmen gegen Angstzustände und ähnliche Krankheiten gesehen werden kann (Hansen *et al.*, 2014). PDE4B<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine gestörte Lipopolysaccharid-stimulierte Produktion von TNF $\alpha$  und gestörte Motorik. Über die Generierung von PDE4C-KO-Mäusen ist bisher nichts bekannt. PDE4C-Expression wurde in spezifischen Bereichen des Gehirns (Cortex, Cerebellum und Bulbus olfactorius) bei Mensch, Affe und Ratte beschrieben (Perez-Torres *et al.*, 2000). Verengungen der Luftröhre nach cholinergischer Stimulation und allergene Reaktionen wurden bei PDE4D<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt. Zusätzlich wurde in PDE4D-KO-Mäusen vermindertes Wachstum und Lernfähigkeit beschrieben (Jin *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2002; Mehats *et al.*, 2003; Siuciak *et al.*, 2007; Rutten *et al.*, 2008).

#### 1.3.5.3.1 PDE7

PDE7 ist vor allem bekannt wegen der Resistenz gegenüber mehreren Inhibitoren, speziell Rolipram, dem spezifischen Inhibitor der PDE4-Familie. Dennoch werden einige wenige PDE7-Inhibitoren klinisch eingesetzt (siehe Tabelle 1) und in Therapie-Ansätzen verwendet. Es sind keine regulatorischen Domänen am N-Terminus bekannt. Die Familie beinhaltet zwei Isoformen: PDE7A und B. Für PDE7A sind drei Transkriptvarianten geläufig. PDE7A1- und PDE7A3-Expression wurde in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und proinflammatorischen Zellen nachgewiesen. Die Inaktivierung von

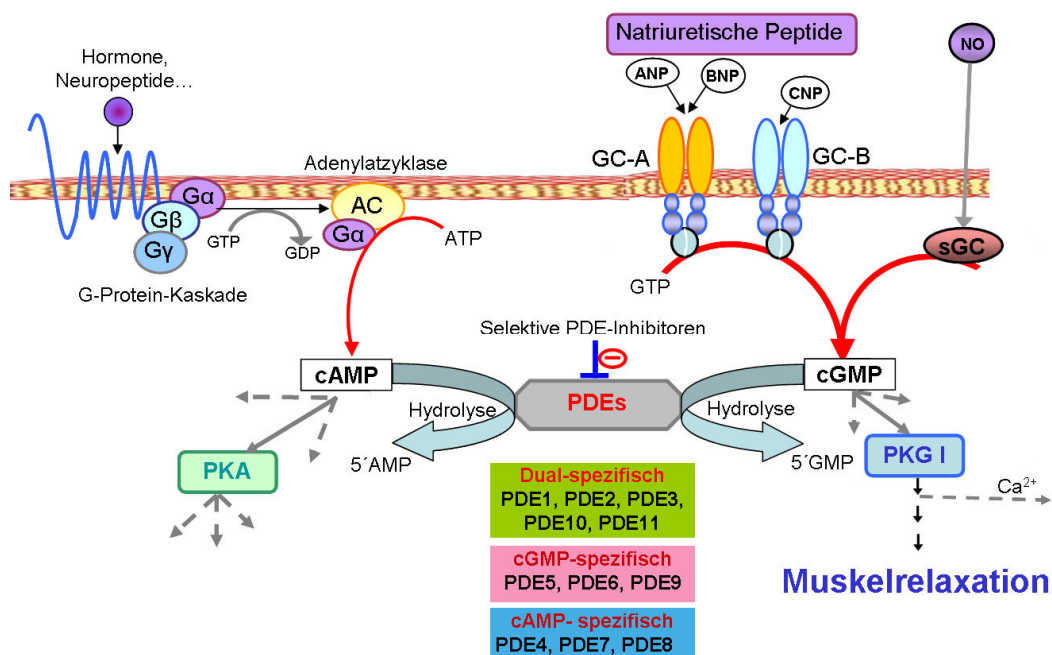
PDE7A in PDE7<sup>-/-</sup>-Mäusen führte, entgegen der Erwartungen, nicht zu einer T-Zell-Aktivierung (Yang *et al.*, 2003). PDE7A2 kommt im Herzen vor. PDE7B1 wurde mit Parkinson und der Huntington Krankheit in Verbindung gebracht (Sasaki *et al.*, 2004).

#### .3.5.2.3 PDE8

Die PDE8-Familie hydrolysiert cAMP mit der höchsten Affinität von allen PDEs und ist resistent gegenüber Rolipram und dem nicht-selektiven PDE-Inhibitor IBMX (Vasta *et al.*, 2006a). Die Primärstruktur der PDE8 enthält eine Rec/Pas-Domäne, deren regulatorische Funktion aber bisher ungeklärt ist (Soderling *et al.*, 1998). Zudem befinden sich PKA und PKG-Phosphorylierungsstellen zwischen der PAS- und der katalytischen Domäne. Zwei Isoformen, PDE8A und PDE8B, sind bekannt.

Hohe Konzentrationen der Isoform PDE8A wurden in Leydigzellen (Vasta *et al.*, 2006), Auge, Leber, Skelettmuskel, Kardiomyocyten (Patrucco *et al.*, 2010) und in niedrigen Konzentrationen in Niere, Ovarien und Gehirn gefunden. PDE8B wurde in Schilddrüse, Plazenta, und Gehirn beschrieben (Hayashi *et al.*, 2002). PDE8A-KO-Mäuse zeigen ein erhöhtes Testosteron-Level und wurden hauptsächlich zum besseren Verständnis der Steroidogenese untersucht (Vasta *et al.*, 2006); (Shimizu-Albergine *et al.*, 2012). PDE8B-KO-Mäuse weisen verbesserte Fähigkeiten der Bewegung, der motorischen Koordination und des Gedächtnisses auf (Tsai *et al.*, 2012).

### 1.3.6 PDEs im Hoden und Nebenhoden



**Abb. 5: Schema des cAMP/cGMP-Signalweges**

Der Signalweg zeigt exemplarisch und schematisch vor allem die Komponenten des cGMP-Signalweges, welche in die Relaxation der Muskelzellen involviert sind.

Phosphodiesterasen stellen ein komplex reguliertes System in der Zelle dar. Ihre Vielfältigkeit und Verteilung in Geweben ist enorm, deshalb stellt die Entwicklung potenter und vor allem selektiver PDE-Inhibitoren einen neuen Fokus in der Therapie systemischer Krankheiten dar.

Vor allem im Hoden und NH ist die zellspezifische Lokalisation der PDEs wenig bekannt. Bisher ist das Wissen über PDE-Expression im Hoden eher auf cAMP-hydrolysierende PDEs, wie PDE1C, PDE4A, PDE4C, PDE7B und PDE8A beschränkt (Bender *et al.*, 2006). In Bezug auf den cGMP-Signalweg sind Transkripte der PDE10 (Fujishige *et al.*, 1999), PDE11A (Keravis *et al.*, 2012) und PDE5 (Volkman *et al.*, 2011; Mietens *et al.*, 2012) im Hoden beschrieben worden (Scipioni *et al.*, 2005).

Im NH ist die Expression und Verteilung von PDEs weitestgehend unbekannt. Es existieren funktionelle Daten über den Einfluss der cGMP-inhibierenden PDE3 auf die Kontraktilität im NH (Mewe *et al.*, 2006a). PDE5 konnte ebenfalls im NH nachgewiesen werden (Mietens *et al.*, 2012).



## 2 Zielsetzung

Hauptziel der Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der Phosphodiesterase (PDE)-Isoformen in den peritubulären Zellen der Lamina propria (LP) menschlicher Hodenkanälchen und in der Muskelschicht des Nebenhoden (NH)-Gangs.

Auf Basis der Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM) sollte zunächst eine Methode entwickelt werden, die eine eindeutige Identifizierung von LP- bzw. NH-Muskelzellbestandteilen und deren Abgrenzung von benachbarten Zelltypen ermöglicht. Darüber hinaus sollte das Potential der LCM nicht nur zur Bestimmung von Transkripten, sondern auch von Proteinen evaluiert werden.

Im Hoden sollte der Unterschied zwischen normaler und fibrotisch verdickter Lamina propria (die mit männlichen Fertilitätsstörungen assoziiert ist) in Hinblick auf das Expressionsprofil von PDE-Isoformen charakterisiert werden. Peritubuläre Zellen sollten isoliert, kultiviert und anschließend zur Quantifizierung der exprimierten PDE-Isoformen genutzt werden. Im Anschluss sollte kontrolliert werden, ob der Myofibroblasten-Phänotyp während der Kultivierung stabil geblieben ist und ob dieser sich von klassischen glatten Muskelzellen anderer menschlicher Organe unterscheidet.

Im NH sollte nach Bestimmung der cGMP-produzierenden Enzyme zusätzlich die PDE-Expression in den Abschnitten Caput, Corpus und Cauda verglichen werden. Die funktionelle Bedeutung der PDE-Isoformen in der Regulation der Muskelkontraktilität sollte ex vivo in Organbadstudien mit Hilfe spezifischer PDE-Inhibitoren charakterisiert werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Agarose Gel Elektrophorese Kammer	PeqLab, Erlangen
Fluoreszenz Mikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss, München
Gel-Dokumentationssystem	Phase, Lübeck
iCycler IQ™ Realtime PCR System	BioRad, München
Kryostat, CM1900	Leica, Wetzlar
Kugelmühle	Retsch, Haan
MasterCycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss, München
Nanodrop 2000 Spektrophometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nuaire™ Bench Class II Biological	
Safety cabinets	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Nuaire™ DH Autoflow CO <sub>2</sub> Air Inkubator	IBS Integra Bioscience, Fernwald
PALM Laser Mikrodisektionssystem	Zeiss, München
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-	
Apparatur (SE600)	Hoefer, San Fransisco, USA
Organbad	Radnoti, CA, USA

##### 3.1.2 Kits

Amersham™ ECL WB Detektionssystem	GE Healthcare, Freiburg
Envision Gl2 double staining Kit	DAKO, Hamburg
GeneAmp® RNA PCR Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
iScript™ cDNA Synthese Kit	BioRad, München
Platinum® SYBR® Green	
qPCR SuperMix-UGD	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mikro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Gefäße (1.5ml/2ml)

Cell Star Tubes (50ml)

Chamber Slide Objektträger

Zellkultur 8 und 24 Wells

Objektträger für Zellen

Kulturflaschen (40ml)

Nalgene® Cryoware

Objektträger 1.0 PEN

Pipettenspitzen

(2,5; 10; 20; 100; 1000µl)

PCR Gefäße(0,2ml)

Pipetten für die Zellkultur

5, 10, 25, 50ml

Zellschaber,

(Länge 25cm, Klinge 1,8cm)

Eppendorf, Hamburg

Greiner bio One, Frickenhausen

Sarstedt, Nürnberg

Greiner bio One, Frickenhausen

Lab Tek®, Scotts Valey, Kalifornien, USA

Greiner bio One, Frickenhausen

Thermo Scientific, Waltham, USA

Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen

Eppendorf, Hamburg

Applied Biosystems, Darmstadt

BD Falcon, Heidelberg und

Greiner Bio one, Frickenhausen Röntgenfilm

Fuji, Tokyo, Japan

BD Biosciences, Bedford, USA

### 3.1.4 Lösungen

1-Chloro-2,2,2-Trifluoroethyl-

Difluoromethylether (Isofluran)

4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI)

β-Mercaptoethanol

Accutase

Acrylamid Lösung, Rotiphorese-Gel-30-

Agarose

Amersham™-Hybond™-Nitrozellulose

Membranen

AmpliTaQ-DNA-Polymerase

Bovine serum albumin (BSA)

Bromophenolblau

Dithiothreitol (DTT)

DNaseI

Abbott, Wiesbaden

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Roth, Karlsruhe

PeqLab, Erlangen

GE Healthcare, Freiburg

Applied Biosystems, Darmstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Invitrogen, Karlsruhe

Thermo Scientific, Waltham, USA

Ethylendinitrilo-N, N, N', N', -tetra-acetic Acid-disodium-salt (EDTA)	Thermo Scintific, Waltham, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Filoceth	Fischer Procryotect, Rüdlingen, Schweiz
GeneRuler™ 100bp DNA Marker	Thermo Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mayer's Hämlaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Noradrenalin (Norepinephrin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Orange-G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalium-Chlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
SigmaMarker™ (Proteinmarker)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek O.C.T	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Western Blockierungslösung	Roche, Mannheim
Xylen	Roth, Karlsruhe

### 3.1.5 Inhibitoren

PDE1-Inhibitor Dioclein	von C. Lugnier Straßburg, Frankreich
PDE2-Inhibitor BAY60-7550	Biomol GmbH, Hamburg (Vertrieb), Hersteller ist Cayman Chemicals (Michigan, USA)
PDE3-Inhibitor Trequinsin	Biomol GmbH, Hamburg
PDE5-Inhibitor Sildenafil	Pfizer, Karlsruhe

### 3.1.6 Primäre Antikörper

#### 3.1.6.1 Fluoreszenz-Immunhistochemie

SMA	Maus-monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ki67	Kaninchen-polyklonal	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar
Vimentin	Maus-monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD90	Maus-monoklonal	Dianova, Hamburg
Calponin	Kaninchen-monoklonal	Epitomics, Burlingame, USA

#### 3.1.6.2 Western Blot

GC-A	Kaninchen-monoklonal	Michaela Kuhn, Würzburg
PDE2A	Kaninchen -monoklonal	FabGenix, Texas, USA
sGC	Kaninchen -monoklonal	Cayman Chemicals, USA
Vinculin	Maus-monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.7 Sekundäre Antikörper

#### 3.1.7.1 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Alexa, 488nm	Ziege-anti-Maus	Roche, Mannheim
Alexa, 488nm	Ziege-anti-Kaninchen	Roche, Mannheim
Cy3, 550nm	Ziege-anti-Maus	Jackson ImmunoResearch, Hamburg
Cy3, 550nm	Ziege-anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, Hamburg

### 3.1.7.2 Western Blot

Ziege-anti-Kaninchen

Pierce, Thermo Scientific, Waltham, USA

Ziege-anti-Maus

Pierce, Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.2 Herkunft des Patientenmaterials

Das humane Hodengewebe stammt aus Beständen des Instituts für Anatomie Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Antrag: Bewilligung durch Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg, Antragsnummer OB.98) und des Instituts für Veterinäranatomie - histologie und -embryologie, Gießen (Antrag: Bewilligung durch Ethikkommission des Fachbereichs Medizin Giessen, Antragsnummer KFO 181, 26/11).

Es standen uns 20 Hodenbiopsien mit gestörter Spermatogenese und verdickter LP, sowie 17 Hodenbiopsien (idiopathische Infertilität) mit normaler Spermatogenese und unauffälliger LP zur Verfügung. Das Alter der Männer variierte zwischen 25-56 Jahren.

Das menschliche Nebenhodengewebe entstammt dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Antrag: Bewilligung durch Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg, Antragsnummer OB.98).

### 3.3 Behandlung der Proben vor der Mikrodissektion

Zunächst wurde von gefrorenem (-80°C) und unfixiertem Probenmaterial bei -20°C in einem Kryostaten (CM1900, Leica, Wetzlar, Deutschland) 10µm Schnitte angefertigt und auf spezielle Membran-beschichtete Objektträger (1.0 PEN-Polyethylenaphthalat, Zeiss, Göttingen) gezogen. Diese wurden zuvor 30min mit UV-Licht von 245nm Wellenlänge bestrahlt, wodurch die Membran hydrophile Eigenschaften ausbildet und die Schnitte somit besser haften konnten, sodass das spätere Lasern erleichtert wurde. Ein positiver Nebeneffekt war ebenso die Sterilisierung und Verminderung potenziell kontaminierender Nukleinsäuren. Die Querschnitte auf den Objektträgern wurden zunächst 3min lang mit Hämatoxylin gefärbt und nur kurz in Wasser entfärbt. Danach sollte eine Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% → 96% → 100% Ethanol) für die Entwässerung des Schnittes sorgen. Nun wurde der Objektträger 10min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, damit der Alkohol verdunstet und der korrekte Einsatz des Lasers gesichert war.

### 3.4 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM)

Um verschiedene Zellpopulationen eindeutig voneinander trennen zu können, wurde die Technik der Laser assistierten Mikrodissektion angewendet (siehe Fink *et al.*, 2005; Fink *et al.*, 2000). Bei diesem Verfahren können unter optischer Kontrolle ganze Zellpopulationen durch ein Laser-Katapult-System aus heterogenem Gewebe isoliert werden. Zur Mikrodissektion von heterogenen Zellverbänden wurde im Zuge dieser Doktorarbeit auf das PALM-Micro-Beam-System der Firma P.A.L.M., Microlaser Technologies (München, jetzt Zeiss) zurückgegriffen.

Das Prinzip dieser Technik basiert auf einer berührungslosen Mikrodissektion durch einen UV-Laser, welcher mit einem inversen Mikroskop gekoppelt ist. Das Schnittpräparat wurde auf einem motorisierten Objektträgertisch fixiert und durch einen Computer gesteuert. Der Laser fokussiert durch die Objektivlinse und schneidet den gewünschten Zellbereich mitsamt Folie aus und katapultiert das Gewebestück in ein steriles Reaktionsgefäß. Durch Adhäsionskräfte verbleiben die gepickten Zellen in dem mit Öl beschichteten Deckel des Eppendorf-Gefäßes. Laser-Fokus und -Energie müssen aufeinander abgestimmt sein, um die gewünschten Gewebebereiche nicht zu beschädigen.

Zur weiteren Analyse wurden die gesammelten Zellen lysiert. Mit entsprechenden kommerziellen Kits (Qiagen, Hilden) wurde die RNA extrahiert (siehe 3.5.2.).

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Geweben wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Gewebe wurde zunächst mit Lysis-Puffer und der entsprechenden Menge  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und anschließend in einer Kugelmühle (Retsch, Haan) für 5min bei 30.000Hz homogenisiert. Zum Entfernen der Zellüberreste wurde das Lysat 3min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1.5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 70% Ethanol gefällt und nach Herstellerangaben isoliert. Die genomische DNA wurde erst im darauf folgenden cDNA-Synthese-Schritt (Punkt 3.5.5.) verdaut. Abschließend wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation aus der Säule eluiert. Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurde diese entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.



### 3.5.2 RNA-Isolierung aus Laser-mikrodisseziertem Gewebe

Das Probenmaterial nach der Mikrodissektion wurde mit dem RNeasy Mikro Kit (Qiagen, Hilden) bearbeitet. Die RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert. Genomische DNA wurde mit DNaseI (Thermo Scientific) für 15min bei RT verdaut. Die gebundene RNA wurde nach mehreren Waschschritten mit RNase-freiem Wasser von der Säulenmembran gelöst.

### 3.5.3 RNA-Isolierung der humanen Hoden-Primärzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen peritubulären Myofibroblasten-Zellen (3.6.1.) erfolgte ebenfalls durch das RNeasy Mini Kit von Qiagen. Nach Abziehen des Mediums wurden die kultivierten Zellen mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe des vom Hersteller beigefügten Lysis-Puffers, welcher zusätzlich mit  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt wurde, wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (BD Bioscience, USA) vom Boden der Kulturflasche gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der RNA erfolgte wie unter (z.B. 2.5.1.) beschrieben.

### 3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden mit dem Nanodrop 2000 Spektrophometer (Thermo Scientific) bestimmt. Für eine Messung genügte bereits 1 $\mu$ l einer Lösung. Als Leerwert diente RNase-freies Wasser.

### 3.5.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA von gepicktem Zellmaterial erfolgte mit dem GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Darmstadt). Es wurden randomisierte Hexamer-Primer (random hexamers) verwendet. Als Enzym wurde die MuLV-reverse-Transkriptase (Maus-Leukämie-Virus) als RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, um Einzelstrang-RNA in einen komplementären DNA-Strang umzuschreiben. Zunächst wurde die RNA für 10min bei 70°C im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen und anschließend mit dem Reaktionsmix (Tab. 2) versetzt. Bei 20°C erfolgte für 10min ein Inkubationsschritt. Die Synthese der cDNA wurde bei 43°C für 1h 15min durchgeführt. Zum Schluss erfolgte ein kurzer Denaturierungsschritt von 5min bei 99°C. Für die Negativkontrolle wurde anstatt der reversen Transkriptase steriles Wasser eingesetzt. Das entstandene Produkt wurde entweder bei -20°C gelagert oder diente als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (3.5.7.)

Tabelle 2: Pipettierschema zur cDNA Synthese der isolierten RNA aus gepickten Proben

<b>Reaktionsmix für 1x Ansatz</b>	<b>Volumen in µl</b>
10x PCR Puffer	3
2mM MgCl <sub>2</sub>	6
10mM dNTPs	1,5
Random Hexamers	1,5
RNase Inhibitor	0,75
MuLV RT	1,5
Steriles Wasser	0,75
Gesamtvolumen	15

Die cDNA-Synthese aus isolierter RNA von ganzen Geweben oder aus kultivierten humanen peritubulären Myofibroblasten-Zellen (3.6.1.) erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthese-Kit von BioRad. Bei diesem Protokoll wurde 1µg RNA umgeschrieben. Zunächst wurde im Thermocycler die genomische DNA mit DNaseI [Thermo Scientific] bei 25°C für 15min verdaut. Durch 25mM EDTA wurde der Prozess bei 65°C innerhalb von 10min gestoppt und die Reaktion 2min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsmix mit der modifizierten MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) reversen Transkriptase und dem 5x iScript Mix versetzt. Hexamer-Primer waren bereits im 5xiScript-Mix vorhanden. Die Angaben des Herstellers zur optimalen Synthese der DNA wurden dabei eingehalten: 5min 25°C, 30min 42°C, 5min 85°C. Für die Negativkontrolle wurde anstatt der reversen Transkriptase steriles Wasser eingesetzt. Das entstandene Produkt konnte entweder bei -20°C gelagert werden oder diente als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (3.5.7.)

Tabelle 3: Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Geweben und kultivierten humanen peritubulären Myofibroblasten-Zellen

<b>Reaktionsmix</b>	<b>Volumen in µl</b>
5x iScript Reaktionsmix	4
iScript RT	1
Steriles Wasser	abhängig vom Volumen der RNA
Gesamtvolumen	20

### 3.5.6 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primersequenzen wurden mit dem Webprogramm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) erstellt. Die Oligonukleotide für PDE-Isoformen wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen, während alle weiteren Primer von der Firma Eurofins MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen wurden. Primersequenzen, die für die semiquantitative PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 4 aufgelistet. Alle Primerlösungen wurden in einer 200pMol/μl Stammlösung angesetzt. Die Primer sollten Intronspannend und optimal eine Länge von ca. 20 Basen aufweisen, einen GC-Gehalt von ca. 50% besitzen und nicht-komplementär zueinander sein. Um die Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurden die Sequenzen mit dem Programm BLAST (**B**asic-**L**ocal-**A**lignment-**S**earch-**T**ool) mit bereits vorhandenen Sequenzen in der Datenbank verglichen.

Tabelle 4: Menschspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide

<b>Gen</b>	<b>Forward 5'→3'</b>	<b>Reverse 5'→3'</b>	<b>Accession number</b>	<b>Größe in bp</b>
<b>PDE1A</b>	CTGGTTGGCTTCTA CCTTTACAC	CTATGCTCTCCACT TGCTTCATT	NM_001003683	240
<b>PDE1B</b>	ACATTCTCTGTGCT GACTGACG	CCTTCCATTTCTGC TTATTCTCC	NM_000924	199
<b>PDE1C</b>	GTCACCTCCAACAA ATCAAAGC	GGTCACACAGAGG AGAAAAAGG	NM_005020	222
<b>PDE2A</b>	ATGCTCTGTGTCCC TGTCATC	CTTGAGTTT236CT GTTCCTTCTGGA	NM_002599	183
<b>PDE3A</b>	CCTCACCTCTCCAA GGGACT	ACTTCTCTCCAGG GGCTCAT	NM_000921	236
<b>PDE3B</b>	ACAGATGATTCTTT GGGATTGG	CAGGAAATGGTGT GAGAGGATTA	NM_000922	242
<b>PDE4A</b>	ATAACTACTCCGAC CGCATCC	CAATAAAACCCAC CTGAGACTTC	NM_006202	219
<b>PDE4D</b>	TACACGGAGATGAC TTGATTGTG	TCTGTTATGGTGG CTTTGTTGA	NM_006203	246
<b>PDE5A</b>	CTATTCCTGTTCCT TGTCTGTG	TGCTTTGTGTCTTG TAGCCTGTA	AY264918	245
<b>PDE6A</b>	CACAGACCTCGCCC TGTATT	TCATGGGAATGGG ATTCTGT	NM_000440.2	278
<b>PDE6B</b>	ACTTCTCGTGGCTG CTGAGT	TCTCCTCCTCCTCC TTCTCC	NM_000283.3	287
<b>PDE6C</b>	CCGAGCTGTCACTT ACCACA	TACTCCAGGTGGT GCCTCTC	NM_006204.3	243
<b>PDE7A</b>	CAGTGGGCTTATTG AGAGAATCA	CAAATGTCTGTGT CTGGTGTCTT	L12052	192
<b>PDE7B</b>	GTTGAGAGGTGTGG CGAAAT	TGTCCAAGGTAGT CTTCATCCAG	NM_018945	296
<b>PDE8A</b>	GGGTGGATAGAGA AGAGTTGTCC	GACTGATAGCCCA TTGTTGTTTC	NM_002605	265
<b>PDE8B</b>	AGAGATTTTACGGA CCACAGAAC	ATTGAGAGATACA AGGGGGAACA	NM_003719	212

<b>PDE9A</b>	ACCTGATGGGTTCA AGCAGAT	TGGACGGACCTCG TTAGAGATA	AF067226	193
<b>PDE10A</b>	GAGATGAACGATTT CCAAGAGG	GCACCTGATGTAT TGCTACTGAA	NM_006661	207
<b>PDE11A</b>	ACTGTGTAGGTGGC TTTTGACA	CATTGTTGGTTCCC CTGTG	NM_016953	203
<b>CatSper I</b> Kationenkanal in Keimzellen	TTTACCTGCCTCTTC CTCTTCT	ACCAGGTTGAGGA AGATGAAGT	AF407333.159	227
<b>NEP</b> Neutrale Endopeptidase	TGTGGCCAGATTGA TTCGT	AGCCTCAGCCGAA CCTACAA	NM_000902.3	411
<b>AMH</b> anti Müller Hormon	TCAGGCCAGCTCT ATCACT	CTGCCTTAAGTGA GCCGAGT	NM_000479.3	179
<b>SMA<math>\alpha</math>-</b> smooth muscle actin $\alpha$ Primerpaar 1	TGTTCACCATCCTC AGTTGC	AGGGCCAGAGAAG ACTAGGG	M33216.1	198
<b>SMA<math>\alpha</math>-</b> smooth muscle actin $\alpha$ Primerpaar 2	TACCGCACTAACGA CTGCAC	GCTGGAAGGTGGA CAGAGAG	M33216.1	140
<b><math>\beta</math> Aktin</b> Housekeeping -Gen	GTGGCATCCACG AAACTACCTT	TCCTCCTGAGCGC AAGTACTC	NM_001101.3	199

Tabelle 5: Rattenspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide

<b>Gen</b>	<b>Forward 5'→3'</b>	<b>Reverse 5'→3'</b>	<b>Accession number</b>	<b>Größe in bp</b>
<b>PDE1 (A, B, C)</b>	CCTGCAGGGAGAC AAAGAAG	GCTGCTTGCCCCA TAGTTAG	NM_030871.1	211
<b>PDE2</b>	AGGTGGTGGAGGA CAAACAG	TCAGTGGCTCGAC TGATGAC	NM_0011438 47.1	130
<b>PDE3A</b>	CCG TAT TCT GAG CCA GGT GT	TGG CGT GGA TTC TGT TAT GA	NM_017337.1	149
<b>PDE3B</b>	GAAGGAGGGAGG GCTAACAC	CCACGAGCAGAAA TCACTCA	NM_017229.1	206
<b>PDE5</b>	GTACGAAGCGGTG GAGAGAG	CGCTGTTTCCAGA TCAGACA	NM_133584.1	193
<b>SMA<math>\alpha</math>-</b> smooth muscle actin $\alpha$	TGTGCTGGACTCT GGAGATG	GAAGGAATAGCCA CGCTCAG	NM_031004.2	148
<b>TRPV6</b> transient receptor potential cation channel, member 6	CTGCAAGTCCAAG GACAAGG	GGTCCTCTGAAGC ACTCTGG	NM_053686.1	259
<b>ANP</b> atriales natriuretisches Peptid	AGAGAGTGAGCCG AGACAGC	TGTTGGACACCGC ACTGTAT	NM_012612.2	152
<b>BNP</b> Brain-type natriuretisches Peptid	GACGGGCTGAGGT TGTTTTA	ACTGTGGCAAGTT TGTGCTG	NM_031545.1	195
<b>CNP</b>	GCACTGTGCACTG	CCTCCCCTCCCCA	NM_053750.1	152

C-Typ natriuretisches Peptid	AGGTCAT	AATAATA		
<b>GC-A</b> Guanylylzyklase A	CTGAGGCCTTGCT TTACCAG	TTGAGCAGAGTCA CCACCTG	NM_012613	226
<b>GC-B</b> Guanylylzyklase B	AATGTCGTTGCCA TCAAACA	GAGCGAGTAGCGA AACATCC	NM_053838.1	172
<b>NPR-C</b> Clearance- Rezeptor der natriuretischen Peptide	TTCTGGCTTTGCAT GAAGTG	ATTTTGAACCGGC CTTCTTT	NM_012868.1	234
<b>β Aktin</b> Housekeeping-Gen	TCATCACTATCGG CAATGAGC	CTCCTTCTGCATCC TGTCAGC	NM_031144.3	209
<b>RPS18</b> ribosomales Protein 18 Housekeeping-Gen	GTGATCCCCGAGA AGTTTCA	TGGCCAGAACCTG GCTATAC	NM_213557.1	292

### 3.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.5.7.1 PCR-Ansatz mit Template-cDNA von ganzen Geweben

Die PCR dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Bestimmt wird diese Sequenz durch zwei spezifische Oligonukleotide (Primer), die jeweils an einem Strang komplementär binden. Als Template diente cDNA, welche aus ganzen Geweben gewonnen wurde. Die Amplifikation der Zielsequenz wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

95°C	12min	
95°C	0:30sec	} 35 Zyklen
<b>60°C</b>	0:20sec	
73°C	0:30sec	
73°C	12min	
4°C	∞	

In diesem Ansatz wurde die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase von Applied Biosystem (USA) verwendet. Die Template-cDNA wurde in den 0,2µl PCR-Gefäßen vorgelegt und anschließend mit dem Reaktionsmix versetzt.

Tabelle 6: Pipettierschema für PCR-Reaktionen von mRNA ganzer Gewebeproben

Reaktionsmix	Volumen in $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer	2,5
2mM $\text{MgCl}_2$	2
10mM dNTPs	0,5
0,4 pMol/ $\mu\text{l}$ Forward Primer	0,5
0,4 pMol/ $\mu\text{l}$ Reverse Primer	0,5
AT Gold Polymerase	0,1
Steriles Wasser	17,9
Gesamtvolumen	25

### 3.5.7.2 PCR-Ansatz mit Template-cDNA von gepickten Proben

Die Vervielfältigung der cDNA von gepicktem Probenmaterial wurde in einem modifizierten Ansatz durchgeführt.

95°C	12min	
95°C	0:30sec	} 42 Zyklen
60°C	0:30sec	
73°C	0:20sec	
73°C	7min	
4°C	$\infty$	

Aufgrund der geringen Anzahl der isolierten Zellen, wurde sowohl die Menge des Templates, das Volumen der DNA-Polymerase, als auch die Anzahl der Zyklen erhöht.

Tabelle 7: Pipettierschema für gepickte Proben

Reaktionsmix	Volumen in $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer	2,5
2mM $\text{MgCl}_2$	2
10mM dNTPs	0,5
0,4 pMol/ $\mu\text{l}$ Forward Primer	0,25
0,4 pMol/ $\mu\text{l}$ Reverse Primer	0,25
AT Gold Polymerase	0,2
Steriles Wasser	16,3

Gesamtvolumen	25
---------------	----

Zur Kontrolle des PCR-Experiments wurden auch Negativproben ohne Template, aber mit DNA-Polymerase amplifiziert, welche als Wasserkontrollen bezeichnet wurden.

### 3.5.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente an Hand ihrer Größe getrennt werden (Sambrock *et al.* 1989). Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung negativ geladener DNA in einem elektrischen Feld. Ein 2%iges Gel aus Agarose und 1xTAE (Tris-Acetate-EDTA) Puffer wurde hergestellt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurden 0,5mg/ml Ethidiumbromid zum Gel hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner Struktur in die DNA-Doppelstränge und kann so unter UV-Licht (245nm) sichtbar gemacht werden. Als Längenstandard diente der 100bp Marker (GeneRuler™ 100bp DNA-ladder, ThermoScientific, USA). Der Lauf der Elektrophorese fand bei 150V und 250mA für ca. 30min statt. Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mit einem Gel Dokumentationssystem (Phase, Lübeck).

### 3.5.9 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time-PCR ermöglicht gleichzeitig die Amplifikation von Nukleinsäuren und ihre Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung. Der Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR-Green ermöglicht es, die Akkumulation des PCR-Produktes in Echtzeit über eine Software (Biorad iQ™ 5 Optical System [BioRad, München]) darzustellen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert dabei mit der doppelsträngigen DNA, kann jedoch nicht zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten unterscheiden. Um falsch-positive Produkte auszuschließen, wurden die Amplikons sowohl in der Schmelzkurvendarstellung als auch im 2%igen Agarosegel überprüft.

In der exponentiellen Phase der Real-Time-PCR verdoppelt sich die Menge der Zielsequenz im Idealfall mit jedem Zyklus. Man spricht hier von einer optimalen PCR-Effizienz (Effizienz=2). Der Beginn der exponentiellen Phase wird zur relativen Quantifizierung der PCR-Amplifikate verwendet. Dabei wird der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einer jeden Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Der Ct-Wert korreliert indirekt proportional mit dem mRNA Ausgangsniveau.

Die relative Quantifizierung der Gene erfolgte nach der Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) über die  $\Delta C_t$ -Methode, d.h. die Zielsequenz wird relativ in ihrer Expression zu einer zweiten Sequenz bestimmt (Bustin 2005). Als Standards dienen sogenannte Housekeeping-Gene wie z.B. das ribosomale Gen RPL30. Diese Gene werden in der Regel konstitutiv in der Zelle exprimiert und sind nicht-reguliert.

$$\text{Ratio (relative Expression)} = 2^{-\Delta C_t}$$

$$\text{Ratio (relative Expression)} = 2^{-(C_t \text{ Gen} - C_t \text{ Housekeeping-Gen})}$$

Wenn das Zielgen genauso stark exprimiert wird wie das Housekeeping-Gen, dann ist die relative Expression gleich eins.

$$2^0 = 1$$

Mit der Festlegung dieses Wertes sind alle Gene, die eine relative Expression höher als 1 aufweisen, in höherer Kopienzahl, bezogen auf das Housekeeping-Gen, in der Zelle vorhanden.

In dieser Arbeit wurde die relative Expression verschiedener Gene isolierter peritubulärer Primärzellen aus Hodenexplantaten in Bezug auf das Housekeeping-Gen RPL30 untersucht. Dabei wurde die Transkriptmenge des Referenz-Gens mit Transkripten von verschiedenen Phosphodiesterasen (PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE3B, PDE5A, PDE8A, PDE9A und PDE10A), kontraktilen (SMA, PKGI, Myh11, Calponin und Smoothelin) und Bindegewebsmarkern (CD90, Vimentin, KollagenI und Fibronektin) verglichen. Die Sequenzen der PDE-Primer stimmen mit den Sequenzen, die auch in der semiquantitativen PCR verwendet wurden, überein (Tab.: 4). Zusätzlich verwendete Primer sind in Tabelle 9 gelistet.

Es erfolgte ein Vergleich zweier Hodenexplantate mit unterschiedlicher LP-Morphologie. Dabei sollte die Expression der Zielgene in isolierten Zellen der unverdickten LP mit isolierten Zellen der verdickten LP verglichen werden. Es standen zwei Biopsien mit unverdickter LP (insgesamt 6 Mittelwerte für die relative Expression eines Zielgens konnten zusammengefasst werden) und eine Biopsie mit verdickter LP (insgesamt 3 Mittelwerte für die relative Expression eines Zielgens konnten zusammengefasst werden) zur Verfügung.



Da man für reproduzierbare Ergebnisse und statistische Auswertungen eine gewisse Anzahl an Versuchen braucht, wurden Zellen ab Passage 3 für Real-Time-PCR-Untersuchungen verwendet. Das Expressionsmuster der Zielgene wurde von Passage 3 bis Passage 6 näher untersucht und charakterisiert. Es wurden jeweils 3 Flaschen mit Zellen pro Passage angesetzt. Die RNA-Isolierung der Zellen ( $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Flasche) erfolgte unabhängig voneinander. Während der cDNA-Synthese wurde eine genau definierte Menge von RNA umgeschrieben.

Von allen humanen peritubulären Zellen wurden RT-Negativkontrollen und Wasserkontrollen für die Real-Time-PCR angefertigt und mitgeführt. Für alle untersuchten Gene fielen diese Kontrollen negativ aus. Die Beständigkeit der Expression jedes Gens wurde über mehrere Passagen (P) untersucht.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Software (CA, USA).

Tabelle 8: Menschenspezifische Primersequenzen für die quantitative Real-Time-PCR

<b>Gen</b>	<b>Forward 5' → 3'</b>	<b>Reverse 5' → 3'</b>	<b>Accession number</b>	<b>Größe in bp</b>
<b>Housekeeping Gen RPL30</b>	ACAGCATGCGGA AAATACTAC	AAAGGAAAATTT TGCAGGTTT	NM_000989.3	158
<b>SMA</b> Smooth muscle Actin $\alpha$ Primerpaar 3	GACAATGGCTCT GGGCTCTGTAA	CTGTGCTTCGTC ACCCACGTA	NM_001613.2	147
<b>PKGI</b> cGMP abhängige Proteinkinase I	GAGGACAGGACT CATCAAG	ACAGCTTCAGGT TGGCGAAG	NM_001098512	467
<b>PKGII</b> cGMP abhängige Proteinkinase II	CTGGGAACCTCA CCACTGTA	TCAGCTGGATGC ACTTGTTT	NM_006259	186
<b>Myh11</b> Myosin heavy chain 11	CTCCGTGCTACA CAACCTGA	CGAGTAGATGGG CAGGTGTT	NM_001040113. 1	182
<b>Calponin</b>	GGAGCTGAGAGA GTGGATCG	CCTGGCTGCAGC TTATTGAT	NM_001299	114
<b>Smoothelin</b>	GGGATCTCACCA GAAAGGAA	TGGAGGTCACAG CAGATCTG	NM_139270.1	116
<b>CD90</b>	GACCCGTGAGAC AAAGAAGC	GCCCTCACACTT GACCAGTT	NM_006288.3	239
<b>Vimentin</b>	CCCTCACCTGTG AAGTGGAT	TCCAGCAGCTTC CTGTAGGT	NM_003380.3	241
<b>Kollagen I Col I</b>	GTGCTAAAGGTG CCAATGGT	ACCAGGTTACCC GCTGTTAC	NM_000088.3	128
<b>Fibronectin</b>	ACCAACCTACGG ATGACTCG	GCTCATCATCTG GCCATTTT	NM_002026	230

Die Reaktion wurde mit dem iCycler iQ™ Real Time PCR System von BioRad (München) unter Zuhilfenahme des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UGD (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Als Templatemenge wurde 1µl cDNA in Triplikaten pro qPCR-Ansatz vorgelegt.

Tabelle 9: Pipettierschema für die qPCR-Versuche von Transkripten aus Myofibroblasten-Primärzellen humaner Hodentubuli

Reaktionsmix	Volumen in µl
SYBR green Mix	10
0,4 pMol/µl Forward Primer	0,5
0,4 pMol/µl Reverse Primer	0,5
Steriles Wasser	8
Gesamtvolumen	20

Die PCR-Programmierung sah wie folgt aus:

95°C	3:30min	
95°C	0:30sec	} 40 Zyklen
<b>60°C</b>	0:30sec	
72°C	0:30sec	
50°C	0:10sec	
20°C	∞	

### 3.6 Zellbiologische Methoden

#### 3.6.1 Kultivierung und Passagierung peritubulärer Zellen des menschlichen Hodens

Hodenbiopsien von Männern mit Fertilitätsproblemen konnten bei einem TESE-Eingriff (Testicular-Sperm-Extraction) gewonnen werden. Ein Teil dieses Gewebes wurde von den Patienten für die Forschung freigegeben. Informationen über den Stand der Spermatogenese beim TESE-Material stammen von der histologischen Begutachtung durch Prof. Martin Bergmann, Veterinärmedizin, Giessen.

Das frische Biopsiematerial wurde direkt in 1x MEM-Medium (Gibco® life technologies, Darmstadt; versetzt mit 100U Penicillin und 100µg/ml Streptomycin) überführt und vereinzelt. Ein Teil der Explantate wurde zur histologischen Untersuchung in Bouin fixiert.

Ein weiteres Stück Gewebe wurde unfixiert in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zusätzlich war es möglich die Tubuli in kleinere Stücke zu zerteilen und für Zellkulturversuche in 1xDMEM-Medium mit 10% FCS (fetales Kälberserum), 100U Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zu überführen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 24-Well-Platten (Greiner bio One, Frickenhausen). Nach ein bis zwei Wochen in Kultur wuchsen elongierte Zellen aus der Tubuliwand (siehe Albrecht M. *et al.* 2006). Nach ca. 4 Wochen waren Wells dicht genug bewachsen, um die Zellen mit Accutase (GE Healthcare, USA) von der Welloberfläche zu lösen. Die Passagierung der Zellen erfolgte in einem Abstand von ca. 2 Wochen bis die Anzahl der Zellen (1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml) hoch genug war, um die Zellen in 40ml Kulturflaschen (Greiner bio One, Frickenhausen) zu überführen.

Verschiedene Passagen der Zellen wurden für RT-PCR und quantitative Real-Time-PCR verwendet. Die Reinheit der peritubulären Zellen wurde anhand RT-PCR mit verschiedenen Markern für Keim-, Leydig- und Sertoli-Zellen überprüft (siehe Punkt 4.1.8).

Ab Passage 3 konnte die Menge der Zellen für reproduzierbare qPCR Versuche (Punkt 4.5.9.) verwendet werden. In dieser Doktorarbeit wurde die Expression der peritubulären Zellen von Passage 3 bis Passage 6 analysiert.

Sämtliche Zellkultur-Arbeiten mit den humanen LP-Zellen wurden unter einer Sterilbank (Nuaire<sup>TM</sup> Bench Class II Biological Safety cabinets, IBS Integra Bioscience, Fernwald) ausgeführt. Ein Medienwechsel erfolgte mindestens einmal pro Woche. Wenn die Zellen den Boden der Kulturflasche lückenlos bis zur Konfluenz bewachsen hatten, wurden 3 Kulturflaschen geerntet und für die RNA-Isolierung vorbereitet. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit sterilem PBS gespült und anschließend mit 1ml RLT-Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) lysiert, welcher zuvor mit der entsprechenden Menge β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber (BD Biosciences, Bedford, USA) vom Boden gelöst und in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA konnte nun wie unter Punkt 2.5.3 isoliert werden. Bei Bedarf konnten die Zellen ebenfalls bei -20°C eingefroren werden, um sie zu einem späteren Zeitpunkt zu bearbeiten.

Eine Flasche der zuvor verarbeiteten Passage wurde zur weiteren Subkultivierung der Zellen genutzt. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe von Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) nach kurzer Einwirkzeit im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Dieser Vorgang wurde repetitiv mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen 10min bei 1500rpm

pelletiert und in frischem vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gründlich mit einer Pipette gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in einem 1:4 Verhältnis in frische Kulturflaschen erneut ausgesät. Gleichzeitig wurden 20.000 Zellen pro Well in 8-Well-Objektträgern (Lab Tek®, Scotts Valey, Kalifornien, USA) ausgesät, um eine immunhistochemische Färbung daran durchzuführen.

### 3.6.2 Kryokonservierung

In regelmäßigen Abständen wurden passagierte Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellsuspensionen pelletiert und in 1ml Filoceth (Fischer Procryotect, Rüdlingen, Schweiz) aufgenommen, um anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden.

### 3.6.3 Fluoreszenz-Immun-Färbung an peritubulären Primärzellen

Die Zellen wurden nach der Passagierung für Immunfluoreszenzanalysen in 8-Well-Objektträgern für noch weitere 24h im Brutschrank kultiviert, um die Festsetzung auf der Unterseite des Wells zu sichern. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Versuche wurden pro Immun-Doppelfärbung im Zweifachansatz ausgeführt. Einige Wells des Objektträgers wurden mit TritonX (Detergenz) behandelt, um das Eindringen des Primäantikörpers Ki67 (Proliferationsmarker) in den Zellkern zu gewährleisten. Um die Bindungswahrscheinlichkeit ungewünschter Proteine zu minimieren, wurde anschließend ein Blockierungspuffer (2%-Normal-Ziegen-Serum verdünnt in PBS) für 1h auf die Zellen pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C.

Schema:

<b>SMA+ Ki67</b> mit TritonX Behandlung	<b>SMA+ Ki67</b> mit TritonX Behandlung
<b>Vimentin+ Ki67</b> mit TritonX Behandlung	<b>Vimentin+ Ki67</b> mit TritonX Behandlung
<b>CD90+ Calponin</b> ohne TritonX	<b>CD90+ Calponin</b> ohne TritonX
Kontrolle mit TritonX Behandlung	Kontrolle ohne TritonX Behandlung

Primärantikörper:

SMA	Maus-monoklonal	→ 1:1000
Ki67	Kaninchen-polyklonal	→ 1:1000
Vimentin	Maus-monoklonal	→ 1:200
Ki67	Kaninchen-polyklonal	→ 1:1000
CD90	Maus-monoklonal	→ 1:50
Calponin	Kaninchen-monoklonal	→ 1:500

Am folgenden Tag wurden die Objektträger 2x 10min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde unter Ausschluss von Licht inkubiert.

Sekundärantikörper:

Für die Färbungen mit SMA+Ki67:

Alexa	Ziege-anti-Maus	1:500
Cy3	Ziege-anti-Ratte	1:500
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)		1:1250

Für die Färbungen mit Vimentin+Ki67 und CD90+Calponin:

Alexa	Ziege-anti-Ratte	1:500
Cy3	Ziege-anti-Maus	1:500
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)		1:1250

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit 4% PFA fixiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus und der Axiovision Software (Zeiss, München). Jeweils 6 Bilder pro Doppelfärbung (SMA+Ki67, Vimentin+Ki67, CD90+Calponin) wurden für die Analyse herangezogen. Die Zellanzahl pro Bild wurde durch die Kernfärbung DAPI bestimmt und anschließend immunpositive Zellen ausgezählt und in Excel mit Prozentrechnung ausgewertet.

#### 3.6.4 Kultivierung klassischer Muskelzellen: Muskelzellen der Lungenarterie (HPASMCs) und Prostata (HPrSMCs)

Sowohl HPASMCs als auch HPrSMCs (Promocell, Heidelberg) wurden in Smooth-Muscle-Cell-Growth-Medium2 (Promocell, Heidelberg) mit zusätzlicher 1%iger Penicillin/Streptomycin-Gabe (Punkt 2.6.1) in 40ml-Kulturflaschen kultiviert. Beide Zelltypen wurden für quantitative Versuche genutzt. Die Passagierung der klassischen Muskelzellen war vergleichbar mit der Passierung der peritubulären Zellen (Punkt 2.6.1). Die Bestimmung der relativen Expression von glatten Muskelzell- und Bindegewebsmarkern erfolgte für HPASMCs von Passage 9 und für HPrSMCs von Passage 4.

### 3.7 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.7.1 Proteinisolierung aus ganzen Hodenschnitten der Ratte

Für Proteinpräparationen, die im Western Blot als Kontroll-Proben eingesetzt wurden, wurden gefrorene Hodenproben von männlichen Wistar-Ratten (3 Monate alt) in einem Mörser pulverisiert und mit Homogenisierungspuffer (10ml/g Gewebe; 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol [DTT] und 0,1mM PMSF) vermischt, um unter Zuhilfenahme eines Potter-Elvehjem-Homogenisators die Zellorganellen mechanisch aufzuschließen. Das Homogenat wurde anschließend bei 3000xg für 8min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet, welches Zelltrümmer und Zellkerne enthält, wurde verworfen, während der Überstand die isolierten Proteine beinhaltet.

Um Cytosolanteile von membranständigen Proteinen zu trennen, wurde das Proteinlysate ein weiteres Mal bei 100.000xg für 30min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die cytosolischen Proteine und wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und eingefroren. Das Pellet enthielt die Membran-assoziierten Proteine und wurde in 50mM Tris Puffer (pH 7.5) gelöst.

Die Proteinkonzentration der jeweiligen Präparationen wurde mit dem BioRad-Protein-Assay (BioRad, München) gemessen, basierend auf der Bradford Methode. BSA (Serumalbumin, Sigma) diente als Standard.

Die Abschätzung von Proteinmengen an ganzen Hodenschnitten der Ratte (Durchmesser ca. 11-13mm) sollte mit der Western Blot-Methode analysiert werden. Dazu wurden im Kryostat 10µm dicke Schnitte von gefrorenen Hodenproben angefertigt und in 1,5ml Gefäße überführt. Durch Vorversuche konnte festgestellt werden, dass pro Schnitt mit 10µm Dicke zwischen 40-50µg Proteine enthalten waren. Da die Proteine der Hodenschnitte nicht so aufgearbeitet werden konnten, wie in der Proteinisolierung ganzer Gewebe durch Zentrifugation, wurde ein Ansatz erarbeitet, um Kontamination mit DNA auszuschließen. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 1.) **Kontrolle:** 5 Schnitte + 27µl H<sub>2</sub>O (vortexen) + 3µl 10x DNaseI Puffer  
(ohne DNaseI-Zugabe, ohne Inkubationsschritt bei 37°C)
- 2.) **Behandlung 1:** 5 Schnitte + 27µl H<sub>2</sub>O (vortexen) + 3µl 10x DNaseI Puffer  
(ohne DNaseI-Zugabe, aber + **Inkubation** bei 37°C, 20min im Thermoblock)
- 3.) **Behandlung 2:** 5 Schnitte + 24µl H<sub>2</sub>O (vortexen) + 3µl **DNase I** + 3µl 10x DNase I Puffer  
(**(Inkubation mit DNaseI, bei 37°C, 20min im Thermoblock)**)

Um die Proteinmengen der Hodenschnitte besser abschätzen zu können, wurden Proben mit membranständigen- und cytosolischen Proteinen bekannter Größe (Membranproteine = 40µg; Cytosolische Proteine = 50µg) in den Versuchsansatz des Experiments aufgenommen. Alle Proben wurden nun mit 15µl 3x Stoppmix (375mM Tris-HCL [pH 6,8], 200mM DTT, 15% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,6 mg/dl Bromphenolblau) versetzt und im

Thermoblock 5min bei 100°C erhitzt. Danach wurden die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen.

Stoppmix	Endkonzentration
Tris HCl pH6.8	100mM
DTT	65mM
Glycin	10%
SDS	5%

### 3.7.2 Proteinisolierung aus gepicktem Hodengewebe von Ratte und Mensch

Die Abschätzung von Proteinmengen der isolierten Tubuli seminiferi bzw. das isolierte Interstitium der Ratte, sollte ebenfalls mit der Western Blot-Methode untersucht werden. Dazu wurden gefrorene Hodenproben wie unter Punkt 2.3. im Kryostat geschnitten und mit Hämatoxylin gefärbt. Die Proben mit Keimepithel und LP wurden ohne interstitielle Areale mit Hilfe der LCM isoliert. Anhand von Vorversuchen wurden in einer Probe 100 (ca. 1 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) Laser-mikrodissezierte Tubuli im Vergleich zu 200 (ca. 2 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) isolierten Tubuli gesammelt. Vom Interstitium wurden ca. 2000 Areale (ca. 1 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) gelasert und in einem 0,5ml-Gefäß gesammelt.

Auch hier wurde zur Bestimmung der Proteinmenge eine Fraktion mit Membranproteinen bekannter Menge (20 $\mu\text{g}$ ) in den Versuchsablauf einbezogen. Durch Vorversuche konnte der ANP- und BNP-Rezeptor GC-A in einem ganzen Hodenschnitt der Ratte nachgewiesen werden. Wir wollten testen, ob das auch in isolierten Tubuli durch LCM der Fall ist.

Im nachfolgenden Experiment sollten andere Proteine des cGMP-Signalweges an isolierten humanen Tubuli nachgewiesen werden. Dazu wurden von zwei unterschiedlichen Menschen 100 Tubuli (3,5 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) und 200 Tubuli (6,5 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) ausgeschnitten. Die unbekannte Menge an Proteinen in Laser-mikrodissezierten Proben sollte anhand bekannter, aber unterschiedlich großer Mengen von cytosolischen- und Membran-Proteinen (10, 20, 30 $\mu\text{g}$  Protein) bestimmt werden.

Anschließend wurden alle Proben mit 15 $\mu\text{l}$  3x-Stoppmix behandelt, gut gemischt und im Thermoblock für 5min bei 100°C erhitzt, um danach auf das SDS-Gel aufgetragen zu werden.



### 3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Das Detergenz SDS (sodium-dodecyl-sulfate) bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, die dadurch denaturiert werden und eine stark negative Ladung erhalten.

Die Proteinproben wurden in die Taschen des 7%igen Trenngels pipettiert. Die Bestimmung des Gewichts unbekannter Proteinbanden erfolgte durch den Vergleich mit einem Protein-Marker (Sigma-Aldrich, USA). Die Auftrennung erfolgte in einem vertikalen SE600-Elektrophorese-System von Hoefer-Scientific-Instruments (MA, USA) bei 13W für eine Stunde, bis die Proben das Sammelgel erreicht hatten. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer Laufzeit von 3 Stunden bei 17W.

Tabelle 10: Verwendete Puffersysteme

<b>Page-Puffer</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris –HCl pH 8.4	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1% (w/v)

<b>Transfer-Puffer</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris	100mM
Glycin	192mM

<b>4x Trenngel-Puffer</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris –HCl pH 8.8	1,5M
SDS	0,1% (w/v)

<b>4x Sammelgel-Puffer</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris –HCl pH 8.8	0,5M
SDS	0,1% (w/v)

<b>12% Trenngel</b>	<b>Volumen</b>
4x Trenngel Puffer	7,5ml
30% Acrylamid/ Bis	7ml
10% Amoniumpersulfat	0,25ml

(APS)	
TEMED	0,05ml
Aqua dest.	14,75ml
Gesamtvolumen	30ml

<b>Sammelgel</b>	<b>Volumen</b>
4x Sammelgel-Puffer	5ml
30% Acrylamid/ Bisacrylamid	2,7ml
10% Amoniumpersulfat (APS)	0,1ml
TEMED	0,025ml
Aqua dest.	2,174ml
Gesamtvolumen	10ml

#### 3.7.4 Western Blot

Nach der Trennung im SDS-Gel wurden die Proteine über Nacht auf eine Amersham<sup>™</sup> Hybond<sup>™</sup> ECL Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, 0,2µm, München) transferiert. Um die Effizienz des Blots zu beurteilen, wurde die Membran 10min bei Raumtemperatur mit Ponceau-Rot gefärbt. Die Positionen der mitgelaufenen, ungefärbten Standardproteine wurden zusätzlich markiert. Die Membran wurde in destilliertem Wasser gewaschen und zur späteren Dokumentation gescannt. Anschließend wurde der Blot 2 Stunden in Blockierungslösung inkubiert.

Im Western Blot mit Proben des Rattenhodens (ganzer Hodenquerschnitt und isolierte Tubuli) wurde die Expression des Proteins GC-A untersucht. Die Inkubation mit dem Primärantikörper [GC-A Antikörper, 125kDa, 1:500, (Michaela Kuhn, Würzburg)], verdünnt in Antikörper-Inkubationspuffer (10% der verwendeten Blockierungslösung in TBS-T, 0,005% Thimoresal), und dem Sekundärantikörper [Ziege-anti-Kaninchen, 1:2000, (Pierce)] erfolgte jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Der Blot mit den isolierten humanen Tubuli-Proben wurde zunächst auf die Expression von PDE2A (101-AP, 97kDa, 1:1000, FabGenix, USA) überprüft. Nach dem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper [Goat-anti-rabbit, 1:2000, (Pierce)]. Die Membran konnte durch Strippen mehrmals verwendet werden. Deshalb war die Untersuchung anderer Proteine am gleichen Blot möglich. In Tab. 12 sind die Komponenten des Puffers gezeigt. Anschließend wurde der Blot mit dem Primärantikörper für die lösliche

Guanylylcyclase sGC (86kDa, 1:5000, Cayman, USA) mit dem Sekundärantikörper [Ziege-anti-Kaninchen, 1:2000, (Pierce)] untersucht. Nach nochmaligem Strippen wurde der Blot anschließend mit dem Strukturprotein Vinculin (116kDa, 1:6000, Sigma) und dem Sekundärantikörper [Goat-anti-mouse, 1:2000, (Pierce)] überprüft.

Tabelle 11: Stripping-Protokoll

<b>Stripping</b>	
5% Magermilch	30min Inkubation
H <sub>2</sub> O	5min waschen
0,5M NaCl/ 0,5M Essigsäure	30min Inkubation
H <sub>2</sub> O	5min waschen
1,5M Tris	2min stoppen
H <sub>2</sub> O	3x5min waschen

Nach mehrmaligem Waschen in TBS-T wurden die Blots mit ECL-Detektionslösung (GE Healthcare, Freiburg) behandelt und das Chemilumineszenz-Signal auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

### 3.8 Funktionelle Untersuchungen

#### 3.8.1 Organbad-Studien

Bei den durchgeführten Organbad-Studien wurde die Kontraktion und Relaxation der Muskelschicht des D. epididymidis der Ratte ex vivo untersucht. Dabei wurde insbesondere der Nebenhodengang aus der Region des Cauda-Abschnittes präpariert. Bei früheren Studien am Rind ((Mewe *et al.*, 2006a; Mewe *et al.*, 2006b) und an der Ratte (Mietens *et al.* 2012) wurden an diesem Abschnitt Spontankontraktionen des D. epididymidis beobachtet. Das entnommene Organ wurde sofort in 1x MEM-Medium (Minimal Essential Medium, Gibco® life technologies, Darmstadt) + 100U Penicillin und 100µg/ml Streptomycin überführt und anschließend unter dem Stereomikroskop (Leica MS5, Wetzlar) präpariert. Ein kurzes Segment des Nebenhodengangs wurde zwischen 2 Metallklammern gespannt und in die Apparatur eingehängt (siehe unten). Insgesamt konnten vier präparierte Nebenhodensegmente in einem Experiment parallel nebeneinander eingespannt werden. Im Organbad wurde das Gewebe ständig mit Nährstofflösung umspült und mit einem Gasgemisch aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> begast. Durch ein Pumpsystem konnte nach Zugabe

von Substanzen, die Lösung bei Bedarf aus den Organbadgefäßen abgelassen werden und durch neuen Puffer ersetzt werden. Das Fassungsvermögen dieser Gefäße beträgt 15ml. Zur Erhaltung der Temperatur von 37°C wurde das Organbad mit vorgewärmtem Wasser umspült.

Zur Kalibrierung und Standardisierung der Versuchsbedingungen wurde die Apparatur vor jedem Versuch mit einem Gewicht von 1g eingestellt. Die in den Klammern eingespannten Segmente wurden nun an einem Glashaken aufgehängt, wobei der Zug auf das Gewebe durch eine Schraube reguliert werden konnte. Die Vorspannung wurde vor jedem Versuch auf ca. 0,6g equilibriert bis sich Spontankontraktionen des Gewebestücks einstellten. Diese ließen sich nun mit spezifischen Substanzen, z.B. Inhibitoren, beeinflussen. Die Darstellung und Analyse der Frequenzen erfolgte über das Programm LabChart (AD Instruments, Colorado Springs, USA).

Die Beeinflussung der Muskelkontraktionen erfolgte durch den Einsatz spezifischer Phosphodiesterase-Hemmer. In dieser Arbeit wurde der Einfluss folgender PDE-Inhibitoren untersucht:

Tabelle 12: Konzentrationen und IC<sub>50</sub>-Werte der verwendeten PDE-Inhibitoren

<b>Inhibitor</b>	<b>IC<sub>50</sub> Wert</b>	<b>Stocklösung</b>
PDE1C-Inhibitor Dioclein	3,2µM	50mM
PDE2-Inhibitor BAY60-7550	4,7nM	10mM
PDE3-Inhibitor Trequinsin	0,3nM	10mM
PDE5-Inhibitor Sildenafil	3,5nM	5mM

Ein möglicher Einfluss von Trequinsin und BAY60-7550 wurden mit einer Dosis Wirkungskurve (1nM → 10nM → 100nM → 1mM) überprüft, während Dioclein, das als nicht käufliches Agens nur begrenzt zur Verfügung stand, mit einer Endkonzentration von 5µM eingesetzt werden konnte. Um die Vitalität des Gewebes am Ende jedes Versuches zu bestätigen, wurde Noradrenalin (10mM Stocklösung) in einer Endkonzentration von 5µM eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen im Hoden

#### 4.1.1 PDE-Isoformen im Hoden des Menschen

Um sich einen Überblick zu verschaffen, welche PDE-Isoformen im humanen Hoden exprimiert werden, wurde zunächst ein Screening mit menschlichen Hodenbiopsien durchgeführt. Dazu wurde unabhängig voneinander in fünf verschiedenen Hodenproben die Expression der PDE-Isoformen mit RT-PCR-Untersuchungen überprüft. Folgende Isoformen konnten in allen fünf Proben nachgewiesen werden: PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4D, PDE5A, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE7A, PDE7B, PDE8A, PDE8B, PDE9A, PDE10A und PDE11A (Abb. 6). Menschliche Lungenproben dienten als Positivkontrolle.

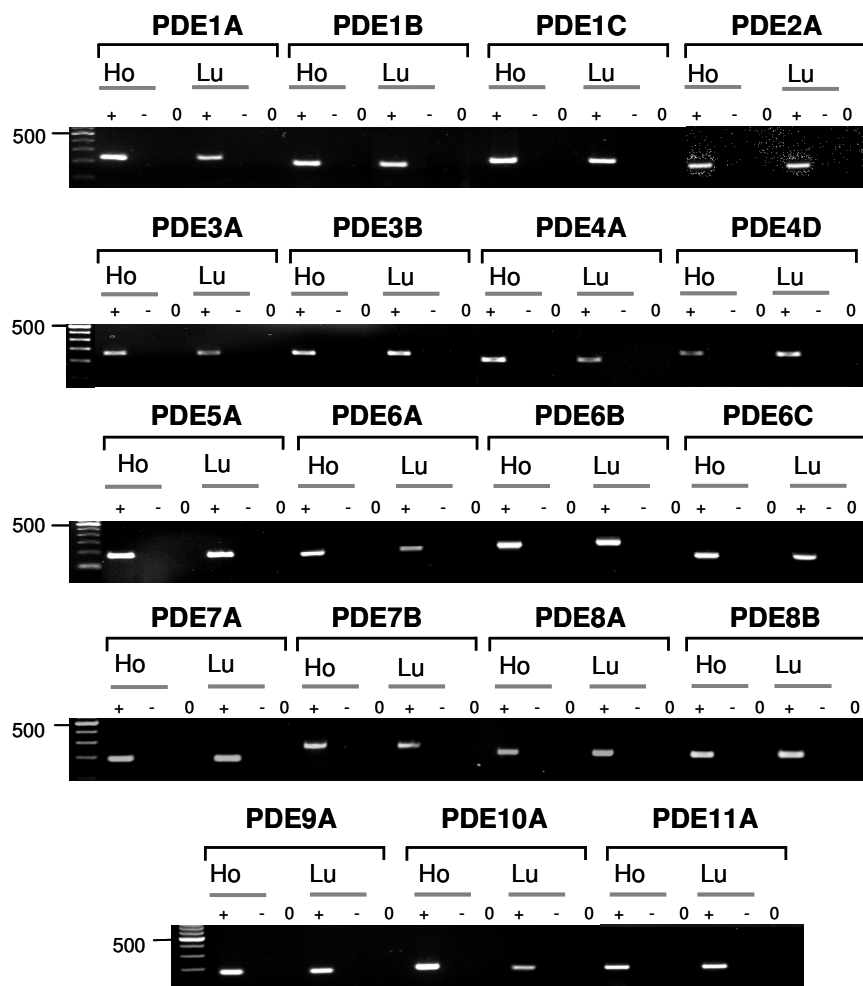
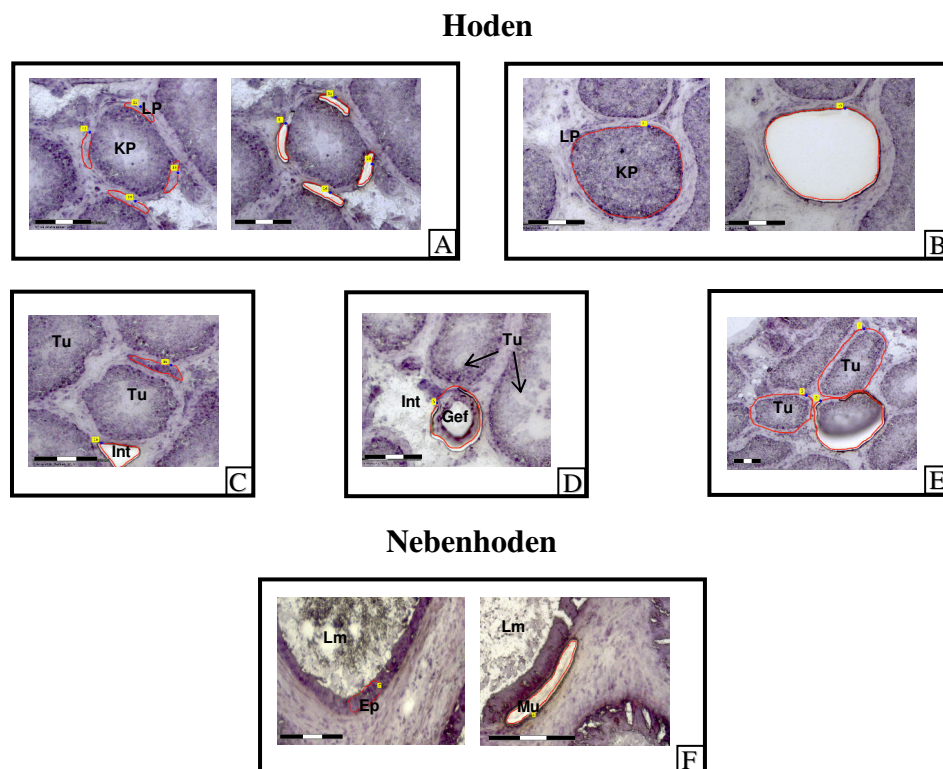


Abb. 6: Nachweis spezifischer PDE-Isoformen in menschlichen Hoden- und Lungenproben

RT-PCR Expressions-Untersuchungen von 19 spezifischen PDE-Isoformen an verschiedenen Gesamtpräparationen des humanen Hodens (Ho) und der Lunge (Lu), die hierbei als Kontrolle diente. Es wurden Primer für folgende PDEs benutzt: PDE1A (240bp), PDE1B (199bp), PDE1C (222bp), PDE2A (183bp), PDE3A (236bp), PDE3B (242bp), PDE4A (219bp), PDE4D (246bp), PDE5A (245bp), PDE6A (278bp), PDE6B (287bp), PDE6C (243bp), PDE7A (192bp), PDE7B (296bp), PDE8A (265bp), PDE8B (212bp), PDE9A (193bp), PDE10A (207bp) und PDE11A (203bp). Als Längenstandard diente ein 100bp DNA-Marker.

Zur genaueren Lokalisierung der PDE-Isoformen wurde eine spezielle Methode von LCM in Kombination mit RT-PCR-Untersuchungen entwickelt. Hierfür wurden, je nach Fragestellung, Expressionsanalysen an isolierter unverdickter und verdickter LP (Abb. 7A), an ausgeschnittenem Keimepithel der Samenkanälchen (Abb. 7B) und an Interstitium-Arealen zwischen den Samenkanälchen (Abb. 7C), sowie den darin eingebetteten Gefäßen (Abb. 7D) durchgeführt. Neben Untersuchungen im Hoden, erfolgten ebenfalls Expressionsanalysen von PDE-Isoformen an isoliertem Epithelgewebe und isolierter Muskelschicht des Nebenhodens (Abb. 7F).



**Abb. 7: Überblick über Gewebeareale, welche zur Etablierung einer modifizierten LCM-Methode verwendet wurden**

A-F: Hämatoxylin gefärbte lichtmikroskopische Aufnahmen eines Hoden- (A-E) und eines Nebenhoden- Querschnittes (F). Mit Hilfe der LCM-Methode wurden unterschiedliche Gewebsverbände aus diesen kryopräservierten Organen isoliert. mRNA-Untersuchungen wurden an isolierter LP (A), an isoliertem Keimepithel ohne LP (B), an interstitiellen Arealen (C) und an Gefäßen (D) aus dem Interstitium des Hodens durchgeführt. Für Western Blot-Analysen wurden ganze Tubuli (Keimepithel mit LP) verwendet (E). An Abschnitten des

NH-Gangs wurden Untersuchungen an isolierter Epithel- und Muskelschicht durchgeführt (F-Mensch).

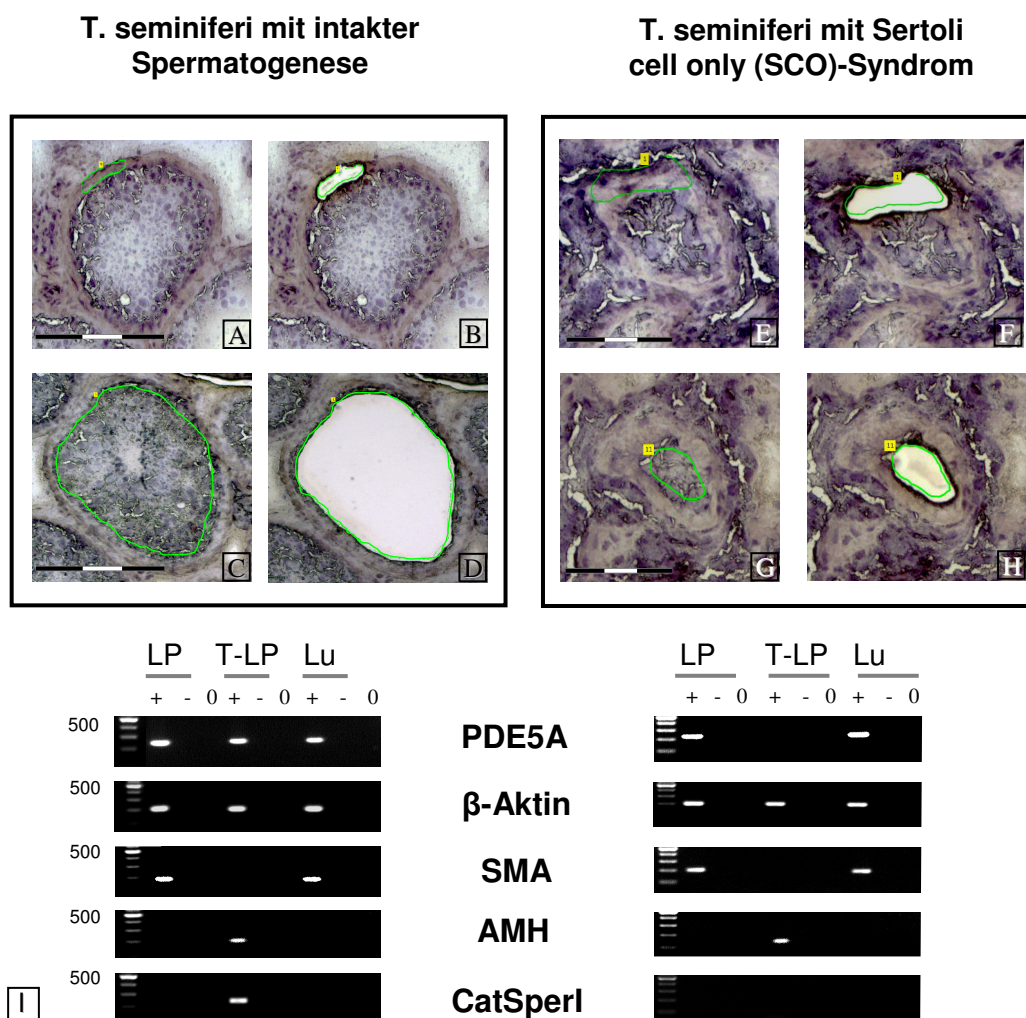
Folgende Abkürzungen werden verwendet: Lamina propria (LP), Keimepithel (KP), Interstitium (Int), Gefäße (Gef), Keimepithel mit Lamina propria (Tu), Epithel (Ep), Muskelschicht (Mu), Lumen des NH-Gangs (Lm). Der Balken gibt eine Länge von 150µm an.

Mit Western Blot-Versuchen war es möglich, zusätzlich Proteine in Laser-mikrodisseziertem Gewebeprouen (Abb. 7E) nachzuweisen.

Unsere Studien bezüglich des Vorkommens und der Eigenschaften der PDE-Isoformen wurden vor allen Dingen mit menschlichem Material durchgeführt. Im Zusammenhang mit funktionellen Untersuchungen wurden auch Experimente mit Rattengewebe durchgeführt.

#### 4.1.2 Einführung in die modifizierte Methode der Laser-Capture-Mikrodissektion am Beispiel der zelltypspezifischen Expression von PDE5A im Hoden

Die Kombination der LCM mit anschließender RT-PCR ist so sensitiv, dass selbst kleinste Verunreinigungen durch nicht gewünschte Zellen beim Vorgang des Auslaserns von Gewebearealen zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können. Durch den Einsatz spezifischer Markergene, die nur in bestimmten Gewebetypen exprimiert werden, war es uns möglich, Zellen eindeutig zu identifizieren und dadurch die Expression spezifischer PDE-Isoformen genau zu lokalisieren. Diese neu entwickelte Methode wird nun am Beispiel der PDE5A in Abbildung 8 erklärt.



**Abb. 8: LCM mit anschließender RT-PCR zum Zelltyp-spezifischen Nachweis der PDE5A im Hoden**

A-H: Hämatoxylin gefärbte lichtmikroskopische Aufnahme von unverdickter LP vor (A) und nach (B) dem Auslasern und von isoliertem Keimepithel ohne LP vor (C) und nach (D) dem Auslasern. Die LCM-Methode wurde auch an isolierter verdickter LP (E-F) und isolierten



intratubulären Gewebe (Gottschalk *et al.*) von Hodenproben mit SCO-Syndrom durchgeführt. Der Balken gibt eine Länge von 150µm an.

I: Durch RT-PCR-Analysen war es möglich PDE5A-mRNA sowohl in unverdickter LP, in verdickter LP des SCO-Syndroms als auch im Keimepithel (T-LP) mit normaler Spermatogenese zu detektieren. Als Positivkontrolle diente menschliches Lungengewebe (Lu). Folgende Primer wurden eingesetzt: Smooth muscle actin (SMA-198bp) als Marker für Muskelzellen, anti-Müller-Hormon (AMH-179bp) als Sertolizell-Marker und CatSperI (227bp) als Keimzell-Marker. Als interne Kontrolle diente das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin (199bp). Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverser Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA-Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

PDE5A-mRNA konnte in der LP und in Keimzellen, jedoch nicht in Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi nachgewiesen werden. Dies war nur durch den Vergleich von Hodenbiopsien mit gesunder Spermatogenese gegenüber Biopsien, die das SCO-Syndrom und somit nur Sertoli-Zellen, aber keine Keimzellen aufweisen, möglich. Durch die Verwendung von zusätzlichen Markern konnte man ein einfaches Ausschluss-Prinzip anwenden, um die genaue Lokalisation von PDE5A zu bestimmen.

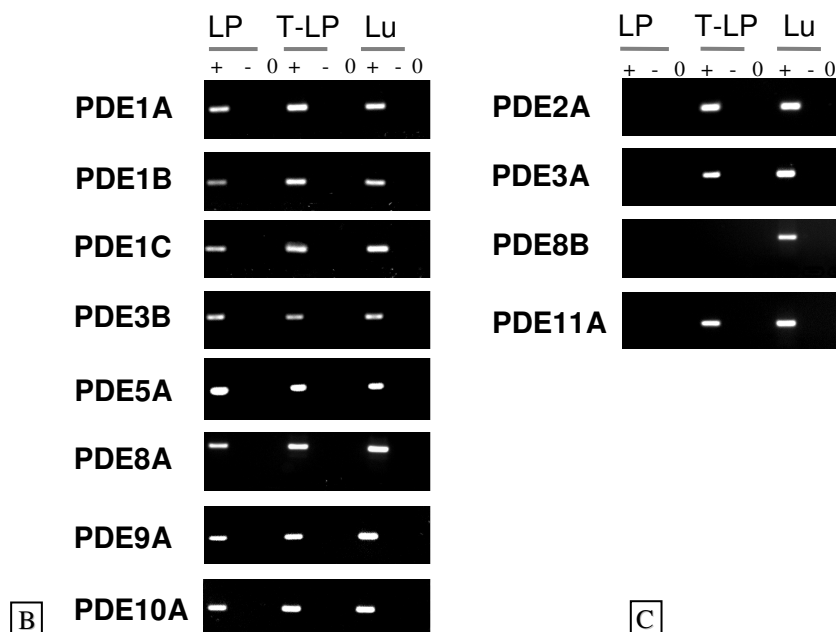
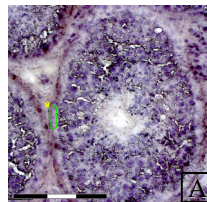
Dazu wurden mRNA-Analysen an ausgeschnittener unverdickter (normal, regulär) Lamina propria [(LP), (Abb. 8A-B)] als auch an Keimepithel (T-LP) mit normaler Spermatogenese (Abb. 8C-D) durchgeführt. Eine menschliche Lungenpräparation (Lu) diente hierbei als Positivkontrolle. PDE5A wurde sowohl in der unverdickten als auch in der verdickten (fibrotischen) LP nachgewiesen. Um Kontaminationen von umgebenden Nachbarzellen auszuschließen, wurden zusätzliche Marker zur Qualitätskontrolle verwendet. Smooth muscle actin (SMA) wurde als Marker für Muskelzellen eingesetzt und sollte den Bereich der ausgeschnittenen LP definieren. Da Sertoli-Zellen das anti-Müller-Hormon (Owens *et al.*) exprimieren (Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999), dienten uns spezifische Primer für AMH als Sertoli-Zellmarker. Um Keimzellen zu identifizieren, wurde das Gen für den Kationen-Kanal CatSperI ausgewählt (Quill *et al.*, 2001). Durch die zusätzliche Kontrolle dieser Markergene konnte PDE5A exakt Keimzellen zugewiesen werden, da AMH in beiden Präparationen (Tubuli mit und ohne Keimzellen) ein positives Signal zeigte, aber PDE5A nur in Proben mit Spermatogenese nachgewiesen werden konnte, welche durch das Vorhandensein von CatSperI definiert wurden. Als Kontrolle für die PCR-Reaktion wurde ein spezifischer Primer für  $\beta$ -Aktin als Housekeeping-Gen eingesetzt.

Die Markergene SMA, AMH und CatSperI wurden standardmäßig in jedem RT-PCR-Versuch verwendet, in dem es um die Lokalisierung spezifischer Zelltypen ging.

#### 4.1.3 Expression ausgewählter PDE-Isoformen in der unverdickten, normalen Lamina propria

Im nächsten Schritt wollten wir uns einen Überblick verschaffen, welche PDE-Isoformen in der LP und im Keimepithel der Tubuli seminiferi vorhanden sind. Durch die LCM-Methode konnten LP und Keimepithel unabhängig voneinander aus Tubuli seminiferi mit intakter Spermatogenese isoliert und mit Hilfe der RT-PCR analysiert werden. Die genaue Lokalisierung der PDE-Isoformen erfolgte durch den Gebrauch der zuvor genannten zusätzlichen, spezifischen Zellmarker (siehe 4.1.2). Repräsentative Ergebnisse konnten unabhängig an mindestens fünf verschiedenen menschlichen Hodenproben reproduziert werden.

#### Ausschnitt eines Tubulusquerschnitts mit unverdickter LP



**Abb. 9: Überblick über die Expression spezifischer PDE-Isoformen in der unverdickten LP und im Keimepithel mit intakter Spermatogenese**

A: Querschnitt eines Hodens mit normaler LP und intakter Spermatogenese. Der Balken gibt eine Länge von 150μm an.

B-C: Es wurden Primer für folgende PDEs benutzt: PDE1A (240bp), PDE1B (199bp), PDE1C (222bp), PDE2A (183bp), PDE3A (236bp), PDE3B (242bp), PDE5A (245bp), PDE8A (265bp), PDE8B (212bp), PDE9A (193bp), PDE10A (207bp) und PDE11A (203bp). Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverser

Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

Im weiteren Verlauf dieser Studien haben wir uns vor allem auf die Expression cGMP-spezifischer und dual-spezifischer Phosphodiesterasen fokussiert. Mit RT-PCR-Untersuchungen konnten die cGMP-spezifischen PDE-Isoformen PDE5A und PDE9A in der unverdickten LP und im Keimepithel nachgewiesen werden. Die dual-spezifischen (cAMP- und cGMP-abbauenden) Phosphodiesterasen PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE3B und PDE10A konnten ebenfalls in der unverdickten LP und im Keimepithel lokalisiert werden.

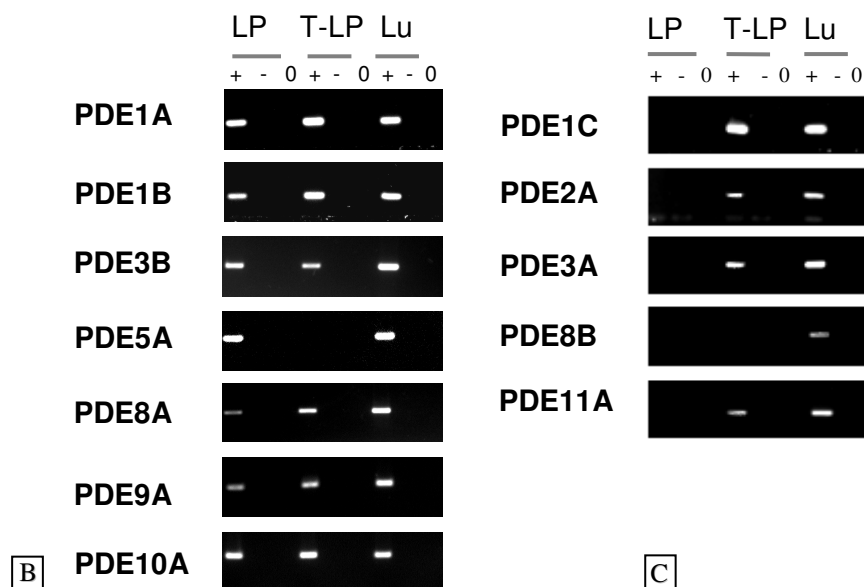
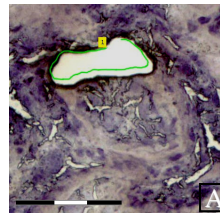
Interessanterweise waren einige PDE-Isoformen: PDE2A, PDE3A und PDE11A nicht in der unverdickten LP, aber im Keimepithel, exprimiert. Dies konnte anhand reproduzierbarer Versuche gezeigt werden, wobei zusätzlich eingesetzte Markergene die Spezifität der Daten belegten (siehe 4.1.2). SMA wurde wie zuvor als glatter Muskelzell-Marker, CatSperI als Keimzell-Marker und AMH als Sertolizell-Marker verwendet.

Die Lokalisation der cAMP-spezifischen PDE-Isoformen PDE8A und PDE8B zeigten eine interessante Besonderheit im Hoden. Während PDE8A-Transkripte spezifisch in isolierter LP und in isolierten Tubuli ohne LP lokalisiert werden konnte, traf dies für PDE8B-Expression nicht zu (siehe Abb. 9). PDE8B-mRNA fehlte sowohl in der LP als auch im Keimepithel. Allerdings waren beide Isoformen (PDE8A und PDE8B) in Gesamt-Präparationen des humanen Hodens durch RT-PCR nachweisbar (siehe Abb. 6). Um die Lokalisation von PDE8B-mRNA im Hoden bestimmen zu können, wurde ein neuer Versuchansatz entwickelt, welcher unter Punkt 3.1.7 (Abb. 14) dargestellt ist.

#### 4.1.4 Expression der PDE-Isoformen in der pathologisch verdickten Lamina propria

Oft treten unterschiedliche Expressionsmuster von Genen im krankhaft veränderten Gewebe eines Organs auf. Deswegen wurde nun die Expression und Lokalisation der PDE-Isoformen im Vergleich zu unverdickter LP, auch an der pathologisch verdickten LP überprüft.

##### Ausschnitt eines Tubulusquerschnitts mit verdickter LP



**Abb. 10: Überblick über die Expression spezifischer PDE-Isoformen in der verdickten LP und im Keimepithel mit gestörter Spermatogenese (SCO-Syndrom)**

A: Querschnitt eines Hodens mit verdickter LP und gestörter Spermatogenese. Der Maßstab wird mit 150µm angegeben.

B-C: In der semiquantitativen PCR wurden Primer für folgende PDEs verwendet: PDE1A (240bp), PDE1B (199bp), PDE1C (222bp), PDE2A (183bp), PDE3A (236bp), PDE3B (242bp), PDE5 (245bp), PDE8A (265bp), PDE8B (212bp), PDE9A (193bp) PDE10A (207bp) und PDE11A (203bp). Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverse Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

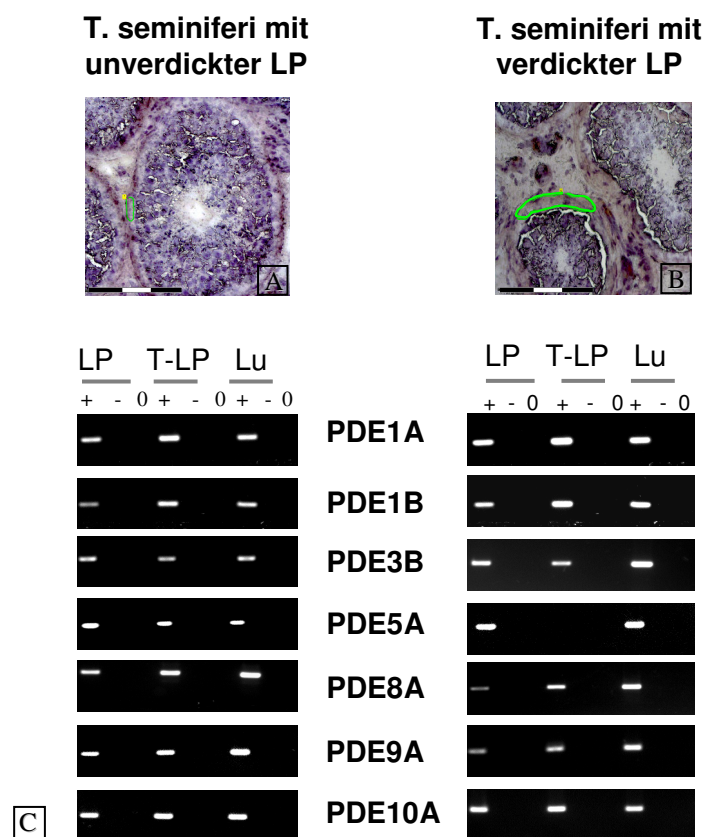
Die cGMP-spezifischen Isoformen PDE5A und PDE9A, sowie die dual-spezifischen Isoformen PDE1A, PDE1B, PDE3B und PDE10A konnten in der verdickten LP

nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch die Expression der cAMP-spezifischen PDE8A in der verdickten LP belegt werden.

Transkripte der dual-spezifischen Isoformen PDE1C, PDE2A, PDE3A und PDE11A, sowie die cAMP-spezifische PDE8B konnten allerdings nicht in der verdickten LP gezeigt werden. Bis auf PDE8B und PDE5A (Abb. 10) konnten die untersuchten PDEs auch in isolierten Keimepithel-Proben der Tubuli seminiferi mit gestörter Spermatogenese detektiert werden.

#### 4.1.5 Vergleich der PDE-Isoformen, die gleichzeitig in unverdickter und verdickter LP nachgewiesen werden konnten

Die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen, die mit isolierter unverdickter und verdickter LP erzielt wurden, konnten nun im nächsten Schritt miteinander verglichen werden (Abb. 11). Zunächst wurden die Daten einander gegenüber gestellt, in denen spezifische PDE-Isoformen sowohl in der unverdickten LP als auch in der verdickten LP lokalisiert werden konnten.



**Abb.11: Darstellung der PDE-Isoformen, die gleichzeitig in der unverdickten und in der verdickten LP exprimiert sind**

A-B: Querschnitt eines Hodens mit normaler LP (A) und verdickter LP (B). Der Balken gibt eine Länge von 150µm an.

C: In der RT-PCR konnten folgende Transkripte in beiden LP-Präparationen nachgewiesen werden: PDE1A (240bp), PDE1B (199bp), PDE3B (242bp), PDE5A (245bp), PDE8A

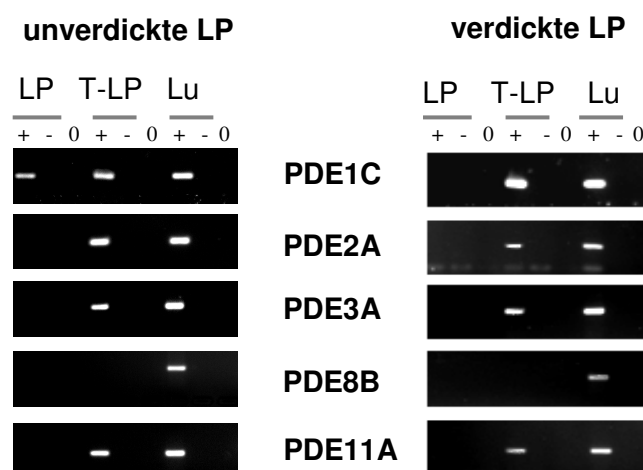
(265bp), PDE9A (193bp) und PDE10A (207bp). Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverse Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

In der unverdickten und auch in der verdickten LP konnten die cGMP-spezifischen Isoformen PDE5A und PDE9A lokalisiert werden, ebenso wie die dual-spezifischen PDE1A, PDE1B, PDE3B und PDE10A. Das Vorkommen von PDE8A, klassifiziert als cAMP-spezifische PDE, ließ sich ebenfalls in beiden LP-Präparationen bestätigen.

Wie zuvor beschrieben (Punkt 4.1.2), war es möglich PDE5A-mRNA mit Hilfe spezifischer Markergene und einem einfachen Ausschluss-Prinzip eindeutig Keimzellen zuzuweisen. Somit konnte man PDE5-Transkripte in Präparationen mit normaler Spermatogenese nachweisen. In Hodenbiopsien mit dem Krankheitsbild SCO besteht der intratubuläre Bereich nur noch aus Sertolizellen, während Keimzellen komplett abwesend sind.

#### 4.1.6 Vergleich der PDE-Isoformen, die weder in unverdickter LP noch verdickter LP exprimiert sind

Wie zuvor beschrieben (Punkt 4.1.3- 4.1.4), konnten einige PDEs nicht in unverdickter oder verdickter LP nachgewiesen werden. In der folgenden Abbildung wurden die Daten miteinander verglichen.



**Abb. 12: Darstellung der PDE-Isoformen, die weder in der unverdickten noch in der verdickten LP exprimiert sind**

In der RT-PCR wurden Primer für folgende PDEs benutzt: PDE1C (222bp), PDE2A (183bp), PDE3A (236bp), PDE8B (212bp) und PDE11A (203bp).

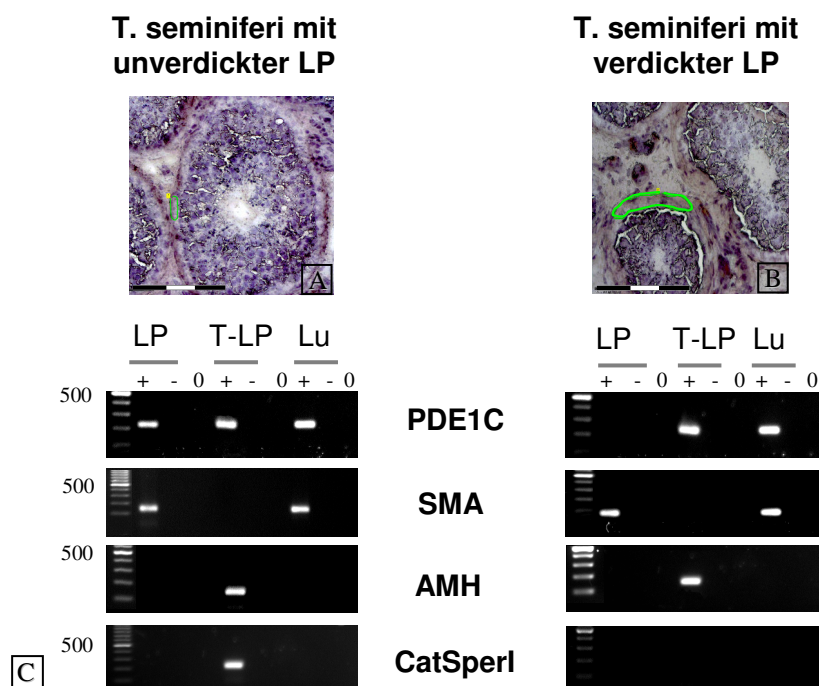
Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverse

Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

Die dual-spezifischen PDE-Isoformen PDE2A, PDE3A und PDE11A konnten weder in isolierter unverdickter noch in verdickter LP nachgewiesen werden. PDE1C ist die einzige PDE-Isoform, die eine Abweichung in der Expression von unverdickter im Vergleich zu verdickter LP zeigte. PDE8B-mRNA konnte hingegen weder in unverdickter und verdickter LP, noch in „Tubuli ohne LP“-Präparationen (mit normaler und gestörter Spermatogenese) nachgewiesen werden.

#### 4.1.7 Besonderheiten bei der Lokalisierung einiger PDE-Isoformen

Wie zuvor erwähnt, sind uns während unserer Untersuchungen verschiedene Besonderheiten im Vorkommen einiger PDE-Isoformen aufgefallen. Die einzige PDE, die nur in der unverdickten, nicht aber in der verdickten LP exprimiert wird, ist die PDE1C (Abb. 9 und 10).



**Abb. 13: Vergleich der Expression von PDE1C in unverdickter und verdickter LP**

A-B: Querschnitt eines Hodens mit unverdickter LP (A) und verdickter LP (B).

C: PDE1C-mRNA (222bp) wurde mit der kombinierten Methode der LCM und anschließender RT-PCR in normaler, aber nicht in verdickter LP nachgewiesen. Als Muskelzell-Marker wurde SMA (198bp), als Sertolizell-Marker AMH (179bp) und als Keimzell-Marker CatSperI (227bp) eingesetzt. Als Längenstandard diente ein 100bp DNA-Marker. Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ und der intratubuläre Bereich mit „Tubuli ohne Lamina propria (T-LP)“ bezeichnet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit

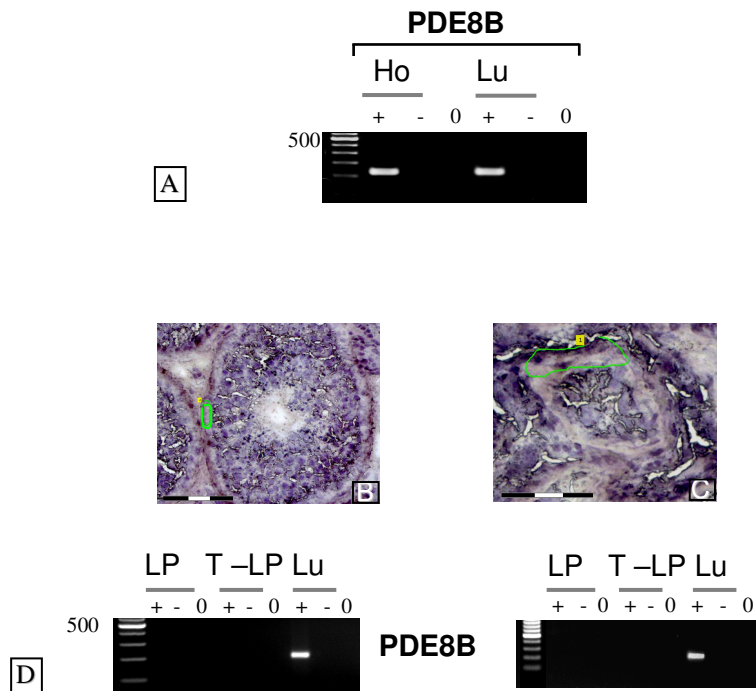
reverse Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

Die Spezifität dieses Befundes zeigte sich durch die zusätzliche Untersuchung Zelltyp-spezifischer Marker (Abb. 13). Kontaminationen konnten durch die Qualitätskontrolle der zusätzlich eingesetzten Markergene ausgeschlossen werden. Die Anwendung spezifischer Primer führte zur Identifizierung von Muskelzellen in isolierten LP-Präparationen. Als Keimzell-Marker diente CatSperI. Keimzellen waren nur nachweisbar in „T-LP“-Präparationen von Probanden mit gesunder Spermatogenese, angezeigt durch ein positives Signal im Agarosegel. Neben dem SCO-Syndrom mit verdickter LP wurden auch Patienten mit diagnostizierter Hypospermatogenese und verdickter LP untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte im Keimepithel durch die Präsenz von CatSperI eindeutig Keimzellen nachgewiesen werden. Durch das Fehlen von Keimzellen beim SCO-Syndrom konnte PDE1C eindeutig Sertolizellen zugeordnet werden, neben der zuvor bereits beschriebenen Keimzell-Lokalisation von PDE1C (Yan *et al.*, 2001).

Wie in Abbildung 8 gezeigt, weist die Lokalisation von PD5A im Hoden ebenfalls eine Besonderheit auf. PDE5-mRNA konnte dabei präzise Keimzellen, aber nicht Sertolizellen zugeordnet werden. Dies wurde ausführlich unter Punkt 3.1.2 beschrieben.

Eine weitere Besonderheit zeigte die Expression der cAMP-spezifischen PDE8B. Die mRNA-Transkripte wurden in der Gesamt-RNA des Hodens (Abb. 6) eindeutig nachgewiesen. Allerdings konnte diese Isoform weder in der isolierten LP (unverdickt und verdickt) und intratubulär bei Tubuli mit normaler oder gestörter Spermatogenese lokalisiert werden (Abb. 14).



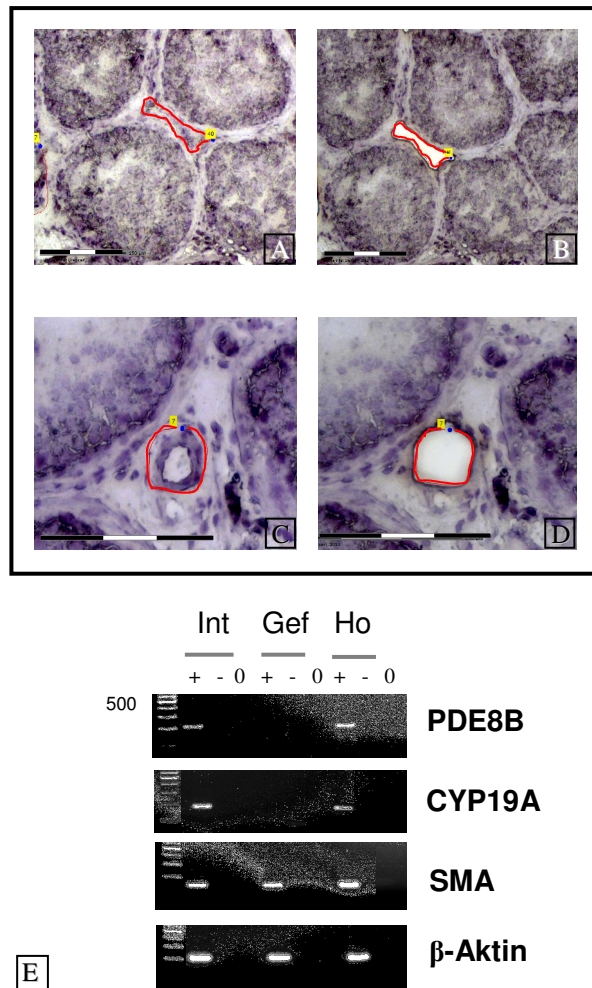


#### Abb. 14: Expression von PDE8B im menschlichen Hoden

A: Expression von PDE8B (212bp) in einer Gesamt-RNA-Präparation des menschlichen Hodens und der Lunge, die als Kontrollorgan diente. B-C: Hämatoxylinfärbung eines Querschnitt eines Hodens mit normaler LP (B) im Vergleich zu verdickter LP (C).

D: Fehlende Expression von PDE8B-mRNA in isolierter unverdickter (B) vs. verdickter LP (C) und dem intratubulären Bereich. Der Balken gibt eine Länge von 150µm an. Als Längenstandard diente ein 100bp DNA-Marker.

Die spezifische Lokalisierung von PDE8B wurde daraufhin in gepickten Interstitium-Arealen untersucht (Abb. 10A-B). Um zu ermitteln, ob PDE8B in Leydigzellen oder in Gefäßen im Interstitium exprimiert wird, wurde ein zusätzlicher Marker zur Bestimmung der genauen Lokalisation verwendet. Als Leydigzell-Marker wurde CYP19A verwendet. Mit Hilfe der LCM-Methode wurden nun größere Gefäße und interstitielle Bereiche isoliert und mit RT-PCR unter Verwendung zusätzlicher Marker analysiert (Abb.11).



### Abb. 15: Lokalisierung von PDE8B im menschlichen Hoden

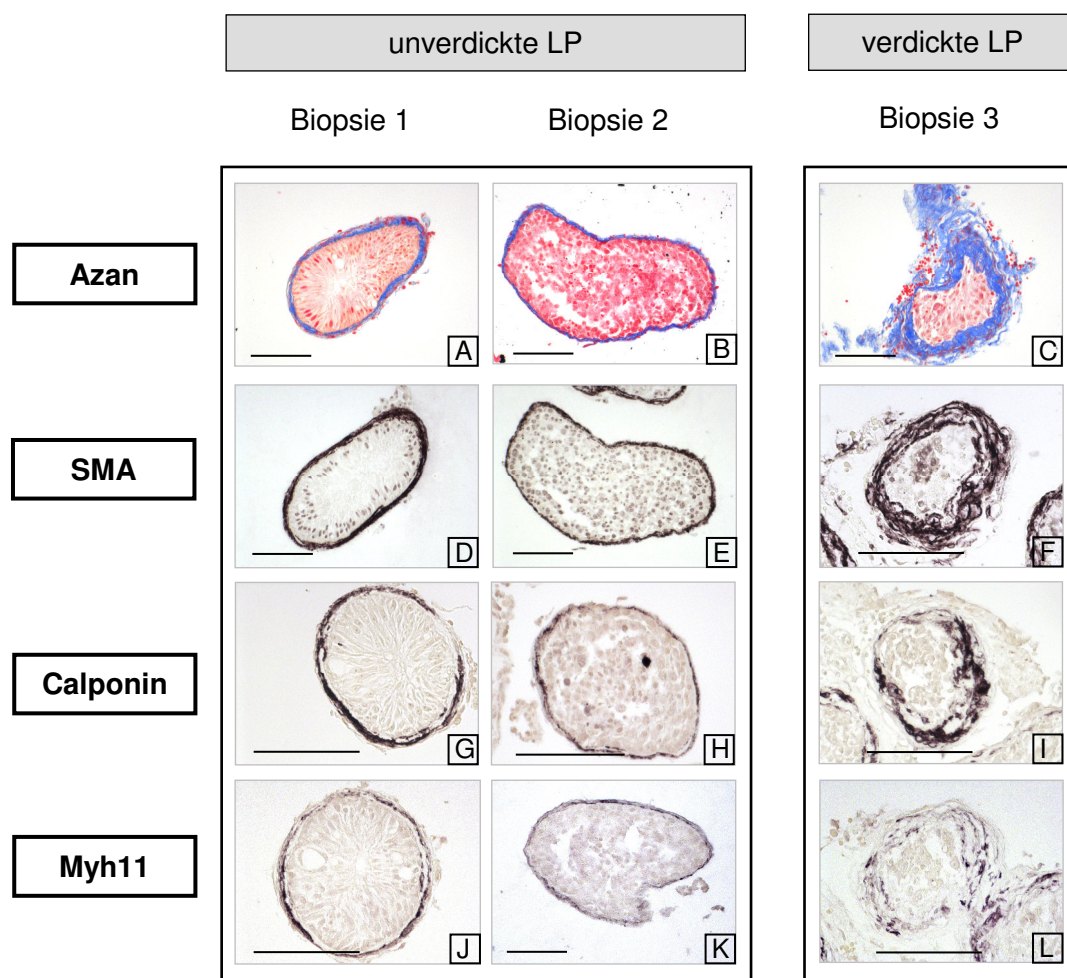
A-D: Hämatoxylinfärbung eines Hoden-Querschnittes. Mit der LCM-Methode wurden interstitielle Areale (A-B) und Gefäße (C-D) ausgeschnitten.

E: PDE8B-Expression (212bp) konnte mit RT-PCR im Interstitium gezeigt werden. Die Qualitätskontrolle der isolierten Proben erfolgte durch die Verwendung des Leydig-Zellmarkers CYP19A (256bp) und Muskelzell-Markers SMA (147bp).  $\beta$ -Aktin (199bp) diente als interne Positivkontrolle. Folgende Abkürzungen werden verwendet: Interstitium (Int), Gefäße (Gef), Gesamtpräparation einer humanen Hodenbiopsie (Ho) als Kontrolle. Der Balken gibt eine Länge von 150 $\mu$ m an. Als Längenstandard dient ein 100bp DNA-Marker.

PDE8B-mRNA konnte in isolierten interstitiellen Arealen nachgewiesen werden, jedoch nicht in ausgeschnittenen Gefäßen. Der Muskelzell-Marker SMA reagierte positiv auf Proben mit isoliertem Interstitium und isolierten Gefäßen, da im Interstitium ebenfalls kleinere muskuläre Gefäße lokalisiert sind. Allerdings konnten nur in der Interstitium-Probe gleichzeitig Leydigzellen, angezeigt durch die Expression von CYP19A, und PDE8B nachgewiesen werden.

#### 4.1.8 Isolierung peritubulärer Zellen aus der Lamina propria menschlicher Hodenbiopsien

Ein bereits bekanntes Primärzell-Modell humaner peritubulärer Zellen (Albrecht, 2009; Albrecht *et al.*, 2006) machten wir uns zunutze, um die Expression der bisher untersuchten PDE-Isoformen quantifizieren zu können. Zunächst wurden Hodenbiopsie-Proben aus TESE-Eingriffen (siehe Material und Methoden 2.6.1.) unter dem Binokular weitest möglich von Bindegewebe befreit und vereinzelt. Ein Teil des Gewebes wurde anschließend für histologische Untersuchungen in Bouin fixiert, um die Morphologie der LP zu begutachten (Abb. 16). Das restliche Gewebe wurde für Zellkulturversuche verwendet (siehe Punkt 4.1.9.-4.1.10).



**Abb. 16: Histologische Beurteilung der Lamina propria-Morphologie**

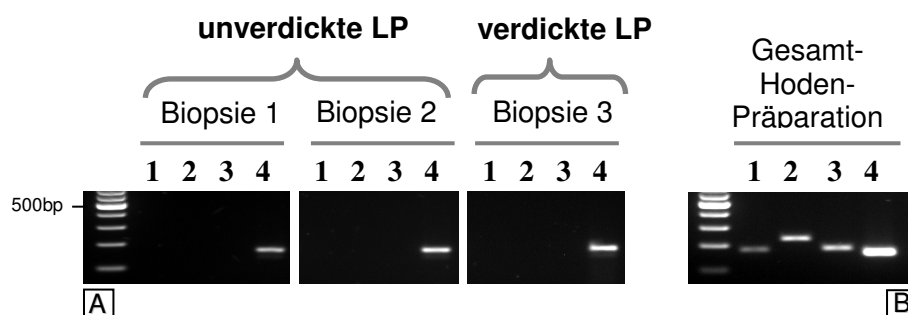
A-L: Einteilung der Hodenbiopsien nach unverdickter (A-K) und verdickter LP (C-L) anhand spezifischer Antikörper gegen kontraktile Proteine wie SMA (D-F), Calponin (G-I) und Myosin-heavy-chain 11 (Myh11; J-L). Zusätzlich erfolgte Azanfärbung (extrazelluläre Matrix blau, Zellkerne rot) zum Nachweis von kollagenen Fasern. Biopsie 1 weist trotz Spermatogenese-Störung eine unverdickte Lamina propria auf. Der Balken gibt eine Länge von 100µm an.

In einer Studie von 2011 (Volkman *et al.*, 2011) wurde beschrieben, dass trotz pathologisch verdickter LP die peritubulären Zellen einen kontraktilen Myofibroblasten-Charakter beibehalten.

Dies wurde nun an Biopsien überprüft durch histologische Begutachtung. In Abbildung 16 wurde die Verdickung der LP durch Azanfärbung (blau, Abb. 16 A-C) sichtbar gemacht. Trotz vermehrter Zunahme der extrazellulären Matrix (EZM) im Fall einer fibrotisch, verdickten LP (Abb. 16C) bleiben kontraktile Elemente erhalten. Dies konnte durch immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen SMA (Abb. 16F), Calponin (Abb. 16I) und Myh11 (Abb. 16L) gezeigt werden.

Vor dem Hintergrund der reduzierten Verfügbarkeit menschlicher Hodenbiopsien wurden zwei Proben mit einer unverdickten LP und eine Probe mit fibrotisch verdickter LP für weitere Untersuchungen herangezogen. Diese wurden sowohl für quantitative Real-Time als auch für immunhistochemische Untersuchungen für Vorversuche ausgewählt.

Für nachfolgende Expressions-Untersuchungen (siehe Punkt 4.1.9.) mussten Verunreinigungen mit anderen Zellen des Hodens, die eventuell aus den Explantaten heraus wuchsen, ausgeschlossen werden. Durch RT-PCR mit gleichzeitiger Verwendung hodenspezifischer Markergene für Leydigzellen (Cyp19A), Keimzellen (CatSperI) und Sertoli-Zellen (AMH) konnten isolierte Zellproben mit unverdickter und verdickter LP auf Kontaminationen nicht gewünschter Zelltypen überprüft werden. (Abb. 17).



**Abb. 17: RT-PCR-Untersuchungen von Primärzellen auf Kontamination benachbarter Zellen der Lamina propria**

A-B: Der Nachweis erfolgte an Primärzell-Lysaten mit RT-PCR. Jeweils zwei Proben von Biopsien mit unverdickter LP und eine Probe mit verdickter LP wurden auf Verunreinigungen benachbarter hodenspezifischer Zelltypen überprüft (A). Zur Kontrolle wurden die Primer auch an einer Gesamt-Hodenpräparation getestet (B).

Primer für folgende Proteine wurden eingesetzt:

- (1)-Cytochrom P450 (CYP19A) als Leydig-Zellmarker (175bp)
- (2)-CatSperI als Keim-Zellmarker (227bp)
- (3)-anti-Müller-Hormon (AMH) als Sertoli-Zellmarker (179bp)

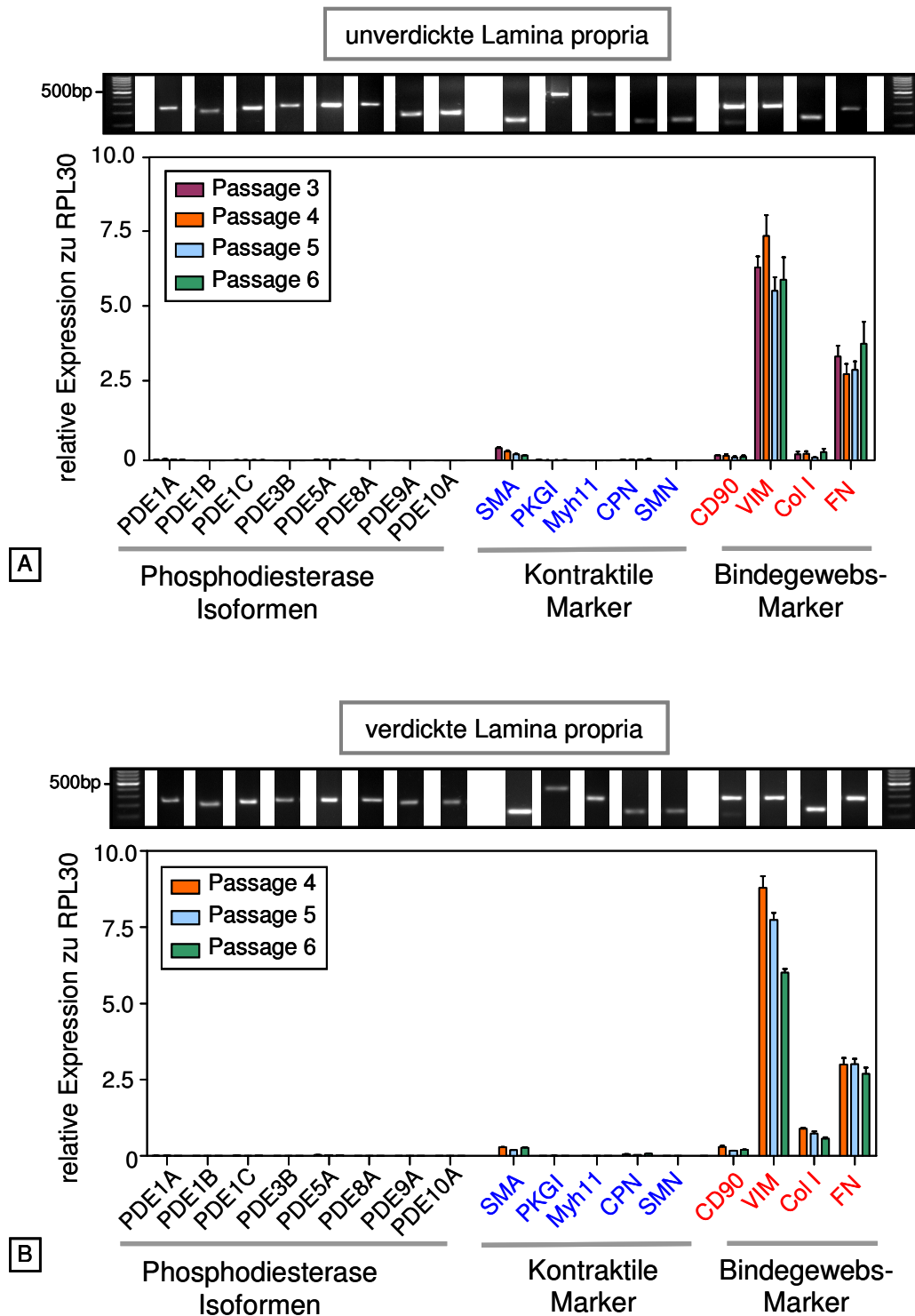
(4)-RPL30 als Housekeeping-Gen (158bp) (A-B).

Es konnte keine Kontamination mit Leydig-Zellen, Keimzellen und Sertoli-Zellen in den menschlichen Primärzell-Lysaten verschiedener Biopsie-Proben festgestellt werden. Die Kontrolle an einer Gesamt-Hodenpräparation zeigte die Expression der überprüften Markergene.

#### 4.1.9 Quantifizierung der PDE-Isoformen in unverdickter und verdickter Lamina propria

Im Folgenden wird das Expressionsniveau der PDE-Isoformen, welche in vivo in der LP vorkommen, in isolierten, kultivierten Zellen der unverdickten und der verdickten LP untersucht.

Neben der Ermittlung der PDE-Expressionslevel erfolgte auch eine Quantifizierung der kontraktilen (SMA, PKGI, Myh11, Calponin und Smoothelin) und Bindegewebsmarker (CD90, Vimentin, KollagenI und Fibronectin) auf Transkriptebene. Die Expression jedes Gens wurde auf den internen Standard RPL30 bezogen, der hier als Housekeeping-Gen verwendet wurde (de Jonge HJ, 2007).



**Abb. 18: Genexpressionsdaten von zwei humanen Hodenbiopsien mit unverdickter LP (A) und einer Hodenbiopsie mit verdickter LP (B)**

A-B: Im oberen Teil beider Abbildungen sind gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente aller in der Real-Time-PCR untersuchten Gene mit spezifischer Banden-Größe dargestellt: PDE1A (240bp), PDE1B (199bp), PDE1C (222bp), PDE3B (242bp), PDE5A (245bp), PDE8A (265bp), PDE9A (212bp), PDE10A (207bp), SMA (147bp), cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKGI, 467bp), Myosin-heavy-chain 11 (Myh11, 182bp), Calponin (CPN, 114bp), Smoothelin (SMN, 116bp), CD90 (239bp), Vimentin (Vim, 241bp), KollagenI (ColI, 128bp) und Fibronektin (FN, 230bp). Als Längenstandard diente ein 100bp DNA-Marker. Die Expression der Gene von Zellen mit unverdickter (A) und verdickter (B) LP

wurden mit der  $\Delta$ Ct-Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. Die Darstellung der mRNA-Daten wird in einem gruppierten Säulendiagramm präsentiert. Die relative Expression der hier untersuchten Gene erfolgte über mehrere Passagen, welche farblich markiert wurden (Bildlegende). Bei Proben mit unverdickter LP wurden 6 unabhängige Versuche pro Passage und bei der Probe mit verdickter LP 3 unabhängige Versuche pro Passage zusammengefasst. In allen Versuchen erfolgten die Real-Time-Messungen in Triplikaten.

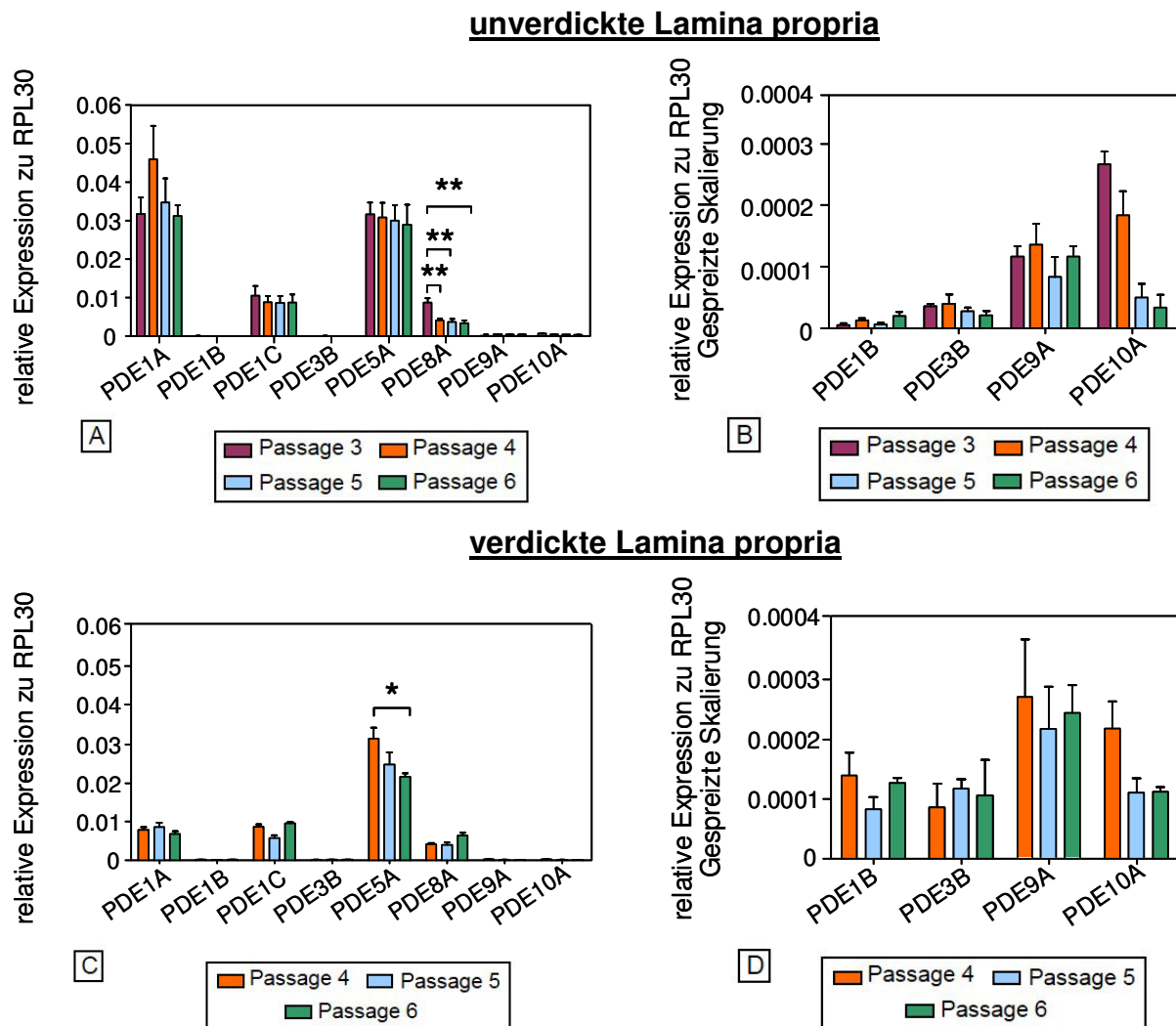
Abbildung 18A-B zeigt die relative Expression der untersuchten PDE-Isoformen im Vergleich zu ausgewählten kontraktile und Bindegewebsmarkern im Überblick. Die Auswertung der mRNA-Daten erfolgte mit den Passagen 4 (P4) bis 6 (P6) von isolierten Zellen zweier Biopsien mit unverdickter LP (Abb. 18A) und einer Biopsie mit verdickter LP von P3 bis P6 (Abb. 18B). Die Auswertung wurde im Methodenteil beschrieben (Punkt 3.5.9).

Da die Spreizung der y-Achse suggeriert, dass nur SMA und die Bindegewebsmarker CD90, Vimentin, KollagenI und Fibronectin exprimiert werden, wurde eine separate Auftrennung der DNA-Fragmente aller verwendeten Gene mittels Agarose-Gelelektrophorese gezeigt (Abb. 18A-B, jeweils oben).

Sowohl bei Zellen mit unverdickter (Abb.18A) und verdickter LP (Abb.18B) war zu sehen, dass das Expressionsniveau der Bindegewebsmarker Vimentin und Fibronectin etwa gleich stark exprimiert war und im Vergleich zu den anderen Transkripten dominierte.

Auch die Bindegewebsmarker CD90 und KollagenI sowie der kontraktile Marker SMA waren in den isolierten Zellen ähnlich stark exprimiert, aber deutlich schwächer als Vimentin und Fibronectin. Die vergleichsweise geringe Expression der untersuchten PDE-Isoformen (PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE3B, PDE5A, PDE8A, PDE9A und PDE10A) und der weiteren kontraktile Marker (PKGI, Myh11, Calponin und Smoothelin) war erst in einer separaten Darstellung mit gespreizter Skalierung erkennbar (Abb. 19-21).





**Abb. 19: mRNA-Expression der PDE-Isoformen in unverdickter und verdickter Lamina propria**

A-D: Vergleichende Darstellung der im iCycler IQ<sup>TM</sup> gemessenen relativen mRNA-Mengen der PDE-Isoformen. Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta$ Ct-Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. A: Relative Expression der PDE-Isoformen von Zellen der unverdickten LP. B: Vergrößerte Darstellung der relativen Expression von PDE1B, 3B, 9A, 10A von Zellen der unverdickten LP. C: Relative Expression der PDE-Isoformen bezogen auf das Housekeeping-Gen RPL30 von Zellen der verdickten LP. D: Vergrößerte Darstellung der relativen Expression von PDE1B, 3B, 9A, 10A von Zellen der verdickten LP. Bei Proben mit unverdickter LP (A-B) wurden 6 unabhängige Versuche pro Passage und bei der Probe mit verdickter LP (C-D) 3 unabhängige Versuche pro Passage zusammengefasst. Durch den Mann-Whitney-Test wurden Unterschiede zwischen jeweils zwei Passagen geprüft. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind mit einem Stern (\*) und hochsignifikante Unterschiede mit  $p < 0,005$  sind mit zwei Sternen (\*\*) gekennzeichnet.

Die Auswertung der quantifizierten PDE-Isoformen erfolgte unter dem Blickpunkt der unterschiedlichen LP-Morphologie (unverdickt *versus* verdickt).

Die Isoformen PDE1A, PDE1C, PDE5A und PDE8A zeigten eine relative Expression von 0,005-0,05 zur RPL30-Expression (Abb. 19A und 19C). Das mRNA-Level von PDE1B,



PDE3B, PDE9A und PDE10A lag deutlich darunter (0,00001-0,0003 der relativen Expression zum Standard RPL30; Abb. 19B und 19D). Dies galt sowohl für die mRNA-Daten der Zellen von unverdickter LP (Abb. 19A-B) als auch für die Daten von Zellen der verdickten LP (Abb. 19C-D).

PDE1A- und PDE5A-Expression von Zellen der unverdickten LP (Abb. 19A) zeigten keinen signifikanten Unterschied von P3 zu P6 (ca. 0,03-0,05 relative Expression). PDE1C war geringfügig schwächer exprimiert als die zuvor genannte PDE1A sowie 5A und wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied innerhalb der untersuchten Passagen auf. Die PDE8A-Expression lag nur geringfügig unter dem Expressionsniveau der PDE1C. Das Transkript wies allerdings Expressionsunterschiede von P4 verglichen zu den weiteren untersuchten Passagen (P5, P6) auf. PDE8A war in P3 signifikant höher exprimiert als in P4, P5 und P6 ( $p=0,002$ , Mann-Whitney-Test). Die geringste relative Expression bezogen auf RPL30 zeigten PDE1B und PDE3B (unter 0,0001 relative Expression bezogen auf den Standard RPL30). PDE9A und PDE10A (relative Expression: 0,0001-0,0003) waren geringfügig stärker exprimiert als die zuvor beschriebenen PDE1B und 3B.

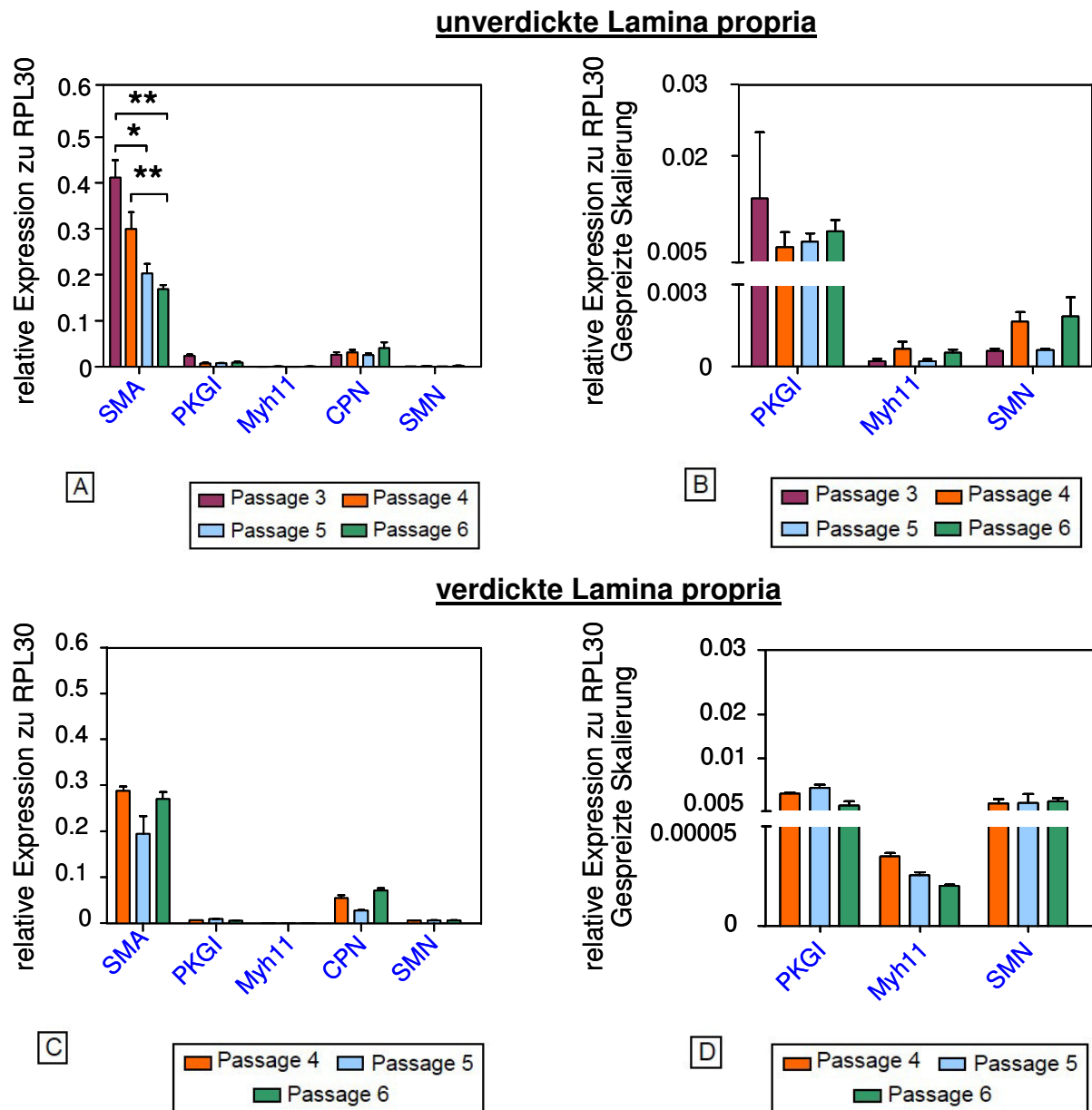
Die Zellen der verdickten LP zeigten ein insgesamt vergleichbares PDE-Expressionsmuster wie die Zellen der unverdickten LP. Unterschiede in der Expression der hier untersuchten Gene zwischen Zellen der unverdickten LP und verdickten LP wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt. Dabei konnte ein Vergleich nur innerhalb derselben Passage durchgeführt werden (Vergleich von P4 unverdickte LP mit P4 verdickte LP usw.).

Die relative Expression von PDE1A lag durchschnittlich unter dem Wert 0,01 (Abb. 19B). Die Expression dieses Transkripts war in Zellen der verdickten LP signifikant vermindert im Vergleich zur PDE1A-Expression in Zellen der unverdickten LP (1Abb. 19A). Dabei wurde ein Unterschied ( $p=0,0238$ ; Mann-Whitney-Test) im direkten Vergleich der Passagen P4 mit P4, P5 mit P5 und P6 mit P6 festgestellt.

PDE1B hingegen war deutlich schwächer exprimiert (relative Expression ca. 0,0001) als PDE1A (relative Expression ca. 0,009, Abb. 14C-D) in Zellen der verdickten LP. Jedoch war PDE1B mit einem signifikanten Unterschied von  $p=0,0238$  (Mann-Whitney-Test) in Zellen der verdickten LP höher exprimiert als in Zellen der unverdickten LP. Dies galt für die Passagen 4, 5 und 6. Die relative Expression von PDE1C lag durchschnittlich bei einem Wert von 0,008. Zwischen Zellen der unverdickten und der verdickten LP konnte kein signifikanter Unterschied der PDE1C-Expression festgestellt werden. Wie zuvor in Zellen der unverdickten LP, wurden ebenfalls vergleichsweise niedrige mRNA-Mengen von PDE3B in

Zellen der verdickten LP gemessen. PDE5A war ähnlich stark exprimiert in Zellen der unverdickten (Abb. 19A) und verdickten LP (Abb. 19C) mit einer relativen Expression von ca. 0,03. Interessanterweise zeigte PDE5A in Zellen der verdickten LP die höchste PDE-Expression (Abb. 19C). In Zellen der unverdickten LP waren PDE1A und PDE5A beinahe gleichwertig dominant exprimiert (Abb. 19A). Allerdings war eine signifikante Abnahme der relativen Expression von PDE5 zwischen P4 und P6 ( $p=0,032$ , Mann-Whitney-Test) in Zellen der verdickten LP zu beobachten. PDE8A-Transkripte wiesen eine relative Expression von 0,005 auf. Somit unterschied sich die Expression dieses Gens wenig im Vergleich zu Zellen der unverdickten LP. PDE9A war nur geringfügig stärker exprimiert in Zellen der verdickten LP im Vergleich zu Zellen der unverdickten LP. In Zellen der verdickten LP war eine Abnahme der PDE10A-Expression von P4 nach P5 und P6 zu beobachten. Die Expression des Gens war allerdings gleich stark sowohl in Zellen der unverdickten als auch der verdickten LP.

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten, peritubulären Zellen der unverdickten und verdickten LP erfolgte die Quantifizierung kontraktiler (SMA, PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) und Bindegewebsmarker (CD90, Vimentin, KollagenI, Fibronectin) bezogen auf das Housekeeping-Gen RPL30. Die Ergebnisse werden nun im Einzelnen dargestellt. Zunächst folgt in Abbildung 20 die Darstellung der relativen Expression der kontraktilen Marker.



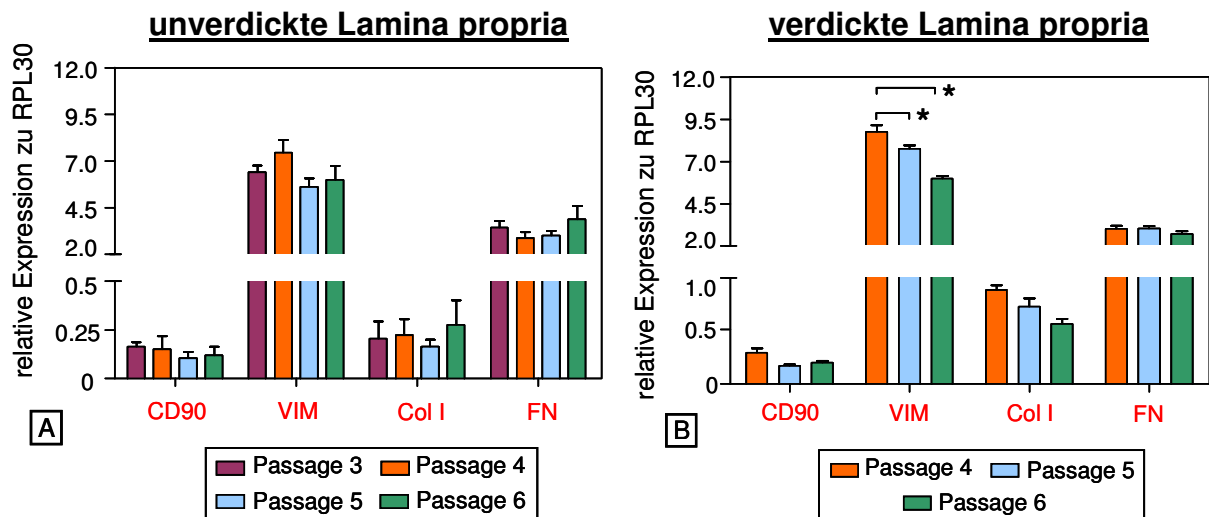
**Abb. 20: mRNA-Expression kontraktile Marker in unverdickter und verdickter Lamina propria**

A-D: Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta C_t$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. A: Relative Expression kontraktile Marker von Zellen der unverdickten LP. B: Vergrößerte Darstellung der relativen Expression von PKGI, Myh11 und Smoothelin von Zellen der unverdickten LP. C: Relative Expression kontraktile Marker bezogen auf das Housekeeping-Gen RPL30 von Zellen der verdickten LP. D: Vergrößerte Darstellung der relativen Expression von PKGI, Myh11 und Smoothelin von Zellen der verdickten LP. Bei Proben mit unverdickter LP (A-B) wurden 6 unabhängige Versuche pro Passage und bei der Probe mit verdickter LP (C-D) 3 unabhängige Versuche pro Passage zusammengefasst. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen geprüft. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind mit einem Stern (\*) und hochsignifikante Unterschiede mit  $p < 0,005$  sind mit zwei Sternen (\*\*) gekennzeichnet.

Das Expressionsmuster der kontraktilen Marker war ähnlich in Zellen der unverdickten und verdickten LP (Abb. 20A-D). SMA wies in Zellen beider LP-Gruppen die höchste Expression der kontraktilen Marker auf (Abb. 20A und C). Allerdings war in Zellen der unverdickten LP eine signifikante Abnahme der SMA-Expression von P3 nach P6 zu beobachten (P3 zu P5,  $p=0,01$ ; P3 zu P6;  $p=0,004$ ; P4 zu P6,  $p=0,009$ ; Mann-Whitney-Test, Abb. 20A). Weniger als die relative Expression von 0,1 bezogen auf den Standard RPL30 wiesen die weiteren kontraktilen Marker Calponin, PKGI, Myh11 und Smoothelin auf. Dies galt sowohl in Zellen der unverdickten als auch verdickten LP (Abb. 20A-D).

Die relative Expression der Transkripte für Calponin und PKGI von Zellen der unverdickten LP waren im Bereich von 0,005-0,06 und blieben über die untersuchten Passagen P3 bis P6 stabil. Am niedrigsten waren Myh11 und Smoothelin exprimiert.

Die relative Expression der kontraktilen Marker in Zellen der verdickten LP zeigten keine signifikanten Expressions-Schwankungen von P4 bis P6. SMA wies, wie bereits erwähnt, die höchste Transkriptmenge (relative Expression von 0,2-0,3) der kontraktilen Marker (Abb. 20C) auf. Die SMA-Expression in Zellen der unverdickten und verdickten LP war ähnlich stark mit Ausnahme der P6. Dort war SMA signifikant höher exprimiert in Zellen der verdickten LP ( $p=0,0357$ , Mann-Whitney-Test). Calponin und PKGI zeigten ein ähnliches Expressionsmuster (relative Expression: 0,005-0,06) im Vergleich zu den Zellen der unverdickten LP. Die Smoothelin-Expression war zwar in Zellen der verdickten LP konstant zwischen den Passagen 4 bis 6, doch in Zellen der verdickten LP wies Smoothelin im direkten Vergleich der Passagen 4 mit 4, P5 mit P5 und P6 mit 6 eine signifikant höhere Expression ( $p=0,0238$ ; Mann-Whitney-Test) als in Zellen der unverdickten LP auf. Myh11 wies im Vergleich zu den anderen kontraktilen Marker (SMA, PKGI, Calponin, Smoothelin) insgesamt die niedrigste Expression der hier untersuchten kontraktilen Marker in Zellen der verdickten LP auf. Es trat keine signifikante Veränderung in Zellen der unverdickten und verdickten LP auf.



**Abb. 21: mRNA-Expression von Bindegewebsmarkern in unverdickter und verdickter Lamina propria**

A-B: Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. A: Relative Expression spezifischer Bindegewebsmarker von Zellen der unverdickten LP. B: Relative Expression spezifischer Bindegewebsmarker von Zellen der verdickten LP. Die Standardabweichung wurde aus den Mittelwerten berechnet und setzte sich bei Proben der unverdickten LP (A) aus 6 pro Passage und bei der Probe der verdickten LP (B) aus 3 pro Passage zusammen. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen geprüft. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

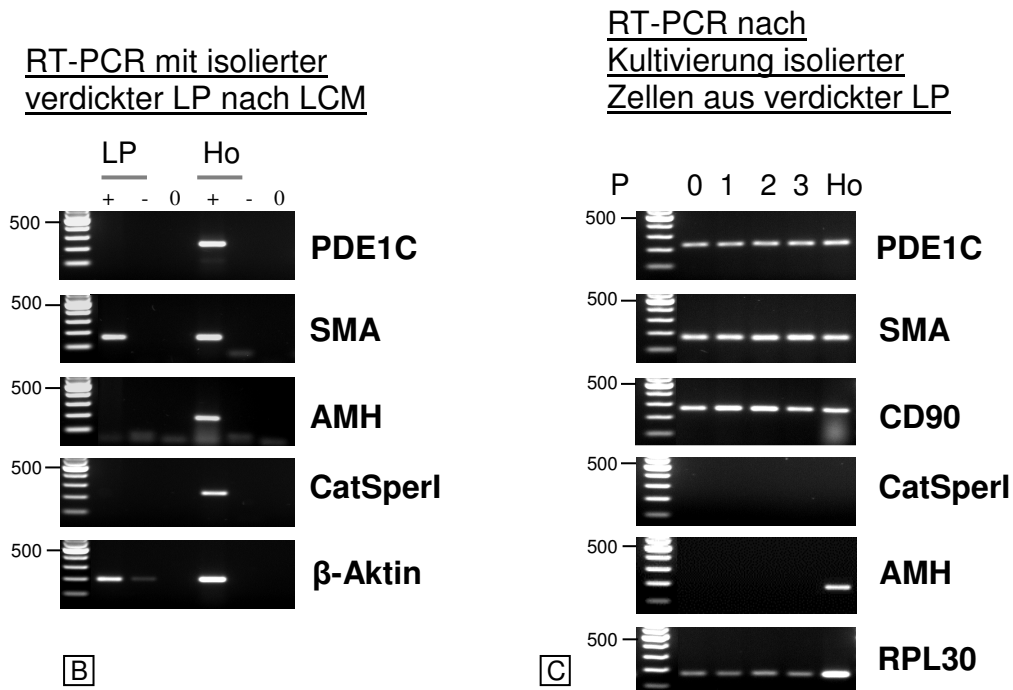
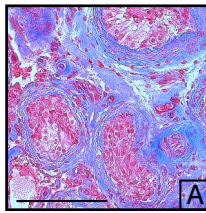
Wie zuvor erwähnt (siehe Abb. 19A-B) wurden in kultivierten Zellen der unverdickten wie auch der verdickten LP hohe und vergleichbare Transkriptlevel der Bindegewebsmarker Vimentin und Fibronectin gefunden. Die Expression anderer untersuchter Bindegewebsmarker (CD90, KollagenI), von kontraktile Markern (SMA, PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) und PDE-Isoformen (PDE1A, 1B, 1C, 5A, 8A, 9A, 10A) war deutlich geringer. Während die Transkriptspiegel von Vimentin und Fibronectin unter beiden LP-Bedingungen die RPL30-Expression um 20-80% überschritten, lagen CD90 und KollagenI etwa 1-5% unter dem RPL30-Expressionsniveau (siehe 3.5.9). Das Expressionsniveau der Bindegewebsmarker von Zellen der unverdickten LP war durchgehend von P3 bis P6 stabil. Eine signifikante Abnahme von Vimentin von P4 nach P5 und P6 (P4 nach P5:  $p = 0,02$ ; P4 nach P6:  $p = 0,025$ ; Mann-Whitney-Test) konnte in Zellen der verdickten LP festgestellt werden. Das Expressionsniveau von CD90 blieb in Zellen beider LP-Gruppen unverändert, während KollagenI in Zellen der verdickten LP signifikant zunahm (Vergleich P4 mit P4, P5 mit P5,  $p = 0,0238$ ; Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur KollagenI-Expression in Zellen der unverdickten LP.

#### 4.1.9.1 PDE1C-Expression bei verdickter LP-Vergleich von Laser-mikrodissezierten LP-Proben mit kultivierten peritubulären Zellen

Wie zuvor erwähnt, konnte PDE1C als einzige der untersuchten PDE-Isoformen mit Hilfe der LCM in Kombination mit RT-PCR in der unverdickten, aber nicht in der verdickten LP nachgewiesen werden (Punkt 4.1.6, Abb. 12; Punkt 4.1.7 Abb. 13). Demgegenüber war PDE1C aber nachweisbar in untersuchten kultivierten peritubulären Zellen der Passagen 3-6, die von Patienten mit verdickter LP stammen (Punkt 4.1.9, Abb. 16).

Durch die nachfolgenden Untersuchungen soll geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt der Zellkultivierung PDE1C wieder gebildet wird. Geschieht dies sobald Zellen aus dem peritubulären Gewebe auswachsen oder erst bei fortschreitender Passagierung?

Diesbezüglich wurden menschliche Hodenbiopsien für verschiedene Versuchsansätze separiert. Ein Teil der Biopsie wurde unfixiert in flüssigem Stickstoff eingefroren, um anhand der LCM-Methode die Lamina propria zu isolieren und durch RT-PCR die Expression von PDE1C zu überprüfen. Gleichzeitig wurde ein anderer Teil derselben Hodenbiopsie für Zellkulturversuche vereinzelt. Die bisherigen Expressionsanalysen fanden an isolierten Zellen der Passagen 3-6 statt. Nun soll durch RT-PCR direkt in Passage 0 ermittelt werden, ob die Zellen im Stadium des Herauswachsens aus der verdickten LP-Schicht die Fähigkeit besitzen PDE1C zu bilden. Die histologische Beurteilung über den Zustand der Spermatogenese und der LP erfolgte an den Biopsien im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen durch Prof. Bergmann (siehe Punkt 3.2.). Die hier verwendete Biopsie wurde als Spermatozytenarrest mit verdickter LP diagnostiziert.



**Abb. 22: Expression von PDE1C in kultivierten peritubulären Zellen der verdickten LP**  
A: Querschnitt einer Hodenbiopsie mit verdickter LP. Azanfärbung zeigt extrazelluläre Matrix in blau. Zellen und Zellkerne werden rot gefärbt. Der Balken gibt eine Länge von 100µm an. B: Aus kryopräserviertem Biopsie-Material wurde die verdickte LP-Schicht mit LCM isoliert und in der RT-PCR mit zusätzlichen Markern, um Kontaminationen mit umgebendem Gewebe auszuschließen, analysiert. C: RNA wurde aus kultivierten Zellen derselben Biopsie mit verdickter LP isoliert und die Expression von PDE1C in den Passagen (P) 0-3 mit RT-PCR bestimmt.

Für folgende Gene wurden Primer eingesetzt: PDE1C (222), SMA (147bp), AMH (179bp), CD90 (239bp) und CatSperI (227bp). Als interne Kontrolle dienten Primer für die Housekeeping-Gene β-Aktin (199bp) und RPL30 (158bp). Die ausgeschnittene Lamina propria wird mit „LP“ bezeichnet. Gesamthoden-Lysat (Ho) wurde als Positivkontrolle verwendet. „+“ zeigt die positive cDNA Probe (mit reverser Transkriptase), „-“, zeigt die negative cDNA Probe (ohne reverse Transkriptase), „0“ steht für die Wasserkontrolle (ohne cDNA).

PDE1C war in vivo nicht in verdickter LP nachweisbar. Kontaminationen durch Keimzellen oder Sertoli-Zellen konnten durch die Qualitätskontrolle mit zusätzlich eingesetzten Primerpaaren für Markergene, wie CatSperI als Keimzell-Marker und AMH als Sertoli-Zellmarker, ausgeschlossen werden.

In kultivierten Zellen derselben Biopsie konnte die Expression von PDE1C allerdings in Passage 0 und den nachfolgenden Passagen 1-3 durch RT-PCR-Untersuchungen wieder nachgewiesen werden. Die peritubulären Zellen von Passage 0 migrieren zu diesem Zeitpunkt vom Tubulus weg und beginnen mit der Proliferation. Der Tubulus wurde vor der RNA-Isolierung der Zellen entfernt und die Zellen durch einen Waschschrift von Mediumresten befreit. In den RNA-Proben der ausgewachsenen LP-Zellen konnten keine Keimzellen oder Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. Dies konnte durch den Gebrauch spezifischer Marker (CatSperI-Keimzell-Marker und AMH-Sertoli-Zellmarker) belegt werden. Die kultivierten LP-Zellen wurden positiv auf Muskelzellanteile durch SMA und auch auf Bindegewebsanteile durch CD90 getestet.

PDE1C scheint eine wichtige Rolle während des Zeitpunkts des Auswachsens der Zellen aus dem Tubulus zu übernehmen. Da PDE1C auch in nachfolgenden Passagen nachgewiesen werden konnte, scheint PDE1C relevant zu sein bei Migrations- und/oder Zellteilungsprozessen.

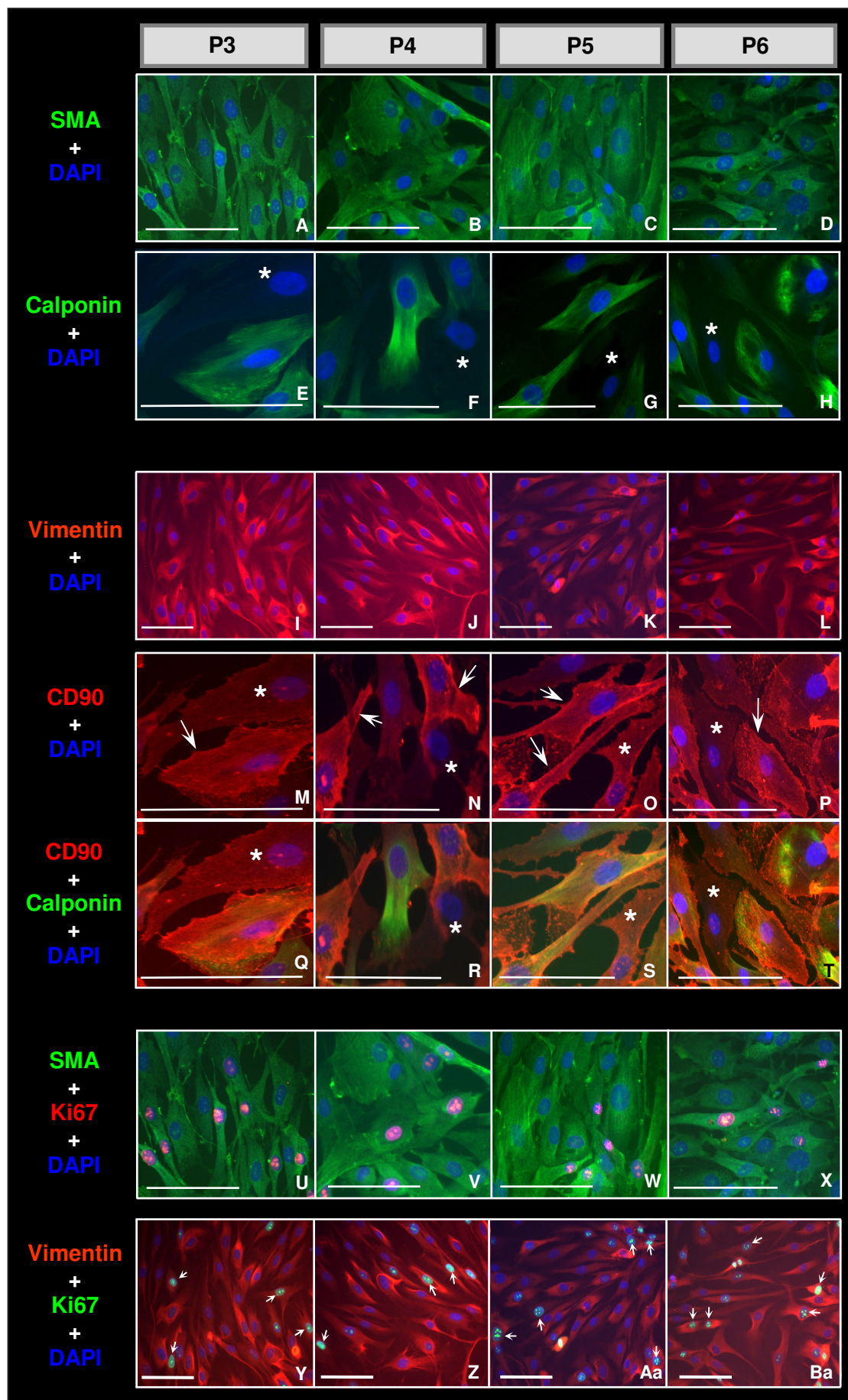
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gleichzeitige Expression von kontraktilen und Bindegewebsmarkern auf Zellen mit Myofibroblasten-Charakter oder auf eine Mischkultur von Muskel- und Bindegewebszellen in Kultur hindeuten. Zur Klärung dieses Punktes wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Muskelzell- (SMA und Calponin) und Bindegewebsproteine (CD90 und Vimentin) durchgeführt. Die Ergebnisse werden ausführlich unter dem nächstfolgenden Punkt 4.1.10 besprochen.

#### 4.1.10 Qualitative und quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Immun-Färbung menschlicher peritubulärer Zellen

Mittels Fluoreszenzchemischer Färbung konnten Proteine, die für kontraktile und Bindegewebszellen charakteristisch sind, in isolierten peritubulären Primärkulturzellen nachgewiesen werden. Für Zellen mit Bindegewebscharakter wurden Antikörper gegen die Proteine CD90 und Vimentin eingesetzt. Um Eigenschaften von Muskelzellen zu demonstrieren, wurden Antikörper gegen SMA und Calponin verwendet. Es wurden sowohl kultivierte, isolierte Zellen der unverdickten als auch der verdickten LP untersucht (Punkt 4.1.8, Abb. 16). Die quantitative Auswertung erfolgte durch Auszählung von positiver Immunreaktion und wurde ausführlich im Methodenteil (Punkt 3.6.3) dargelegt.

Die Immunfluoreszenzanalysen wurden routinemäßig an den Passagen P3-P6 bei Zellen der unverdickten LP durchgeführt.





**Abb. 23: Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen der unverdickten LP (Biopsie 1)**

A-Ba: Immunhistochemische Färbung von peritubulären Zellen mit verschiedenen Antikörpern. Alle Zellen können durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Färbung) identifiziert werden. Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an. A-D: SMA-positive (+) Färbung (grün) der Zellen. E-H: Zellen, welche das kontraktile Protein Calponin exprimieren, wurden durch eine grüne Immunfluoreszenz charakterisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen hin. I-L: Die rote Immunfluoreszenz stellt Vimentin<sup>+</sup>-Zellen dar. M-P: CD90<sup>+</sup>-Zellen werden ebenfalls durch eine rote Fluoreszenzfärbung dargestellt. Der Bindegewebsmarker CD90 wird in Zellmembranen exprimiert (weißer Pfeil). Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative (E-H), aber CD90-positive Zellen hin. Q-T: Eine Kolokalisierung von CD90 und Calponin wird durch die Überlagerung von rot und grün im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen (E-H), aber CD90<sup>+</sup>-Zellen (M-P) hin. U-X: Gleichzeitige Darstellung von grüner Färbung (SMA<sup>+</sup>) des Cytoskeletts und roter Kernfärbung, welche den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert. Y-Ba: Überlagerung von roter Fluoreszenz (Vimentin<sup>+</sup>) und grüner Kernfärbung, welche ebenfalls den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert.

Der kontraktile Marker SMA konnte in isolierten Zellen der Biopsie 1 mit unverdickter LP nachgewiesen werden. Die SMA-Färbung war durchgängig in den untersuchten Passagen P3 bis P6 detektierbar. Alle untersuchten Zellen, die durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) leicht identifiziert werden konnten, waren SMA<sup>+</sup> (Abb. 23A-D), als Hinweis auf einen Muskelzell-Phänotyp aller Zellen. Die Immunreaktion der einzelnen Zellen differierte aber deutlich.

Auch der kontraktile Marker Calponin konnte in isolierten Zellen aller untersuchten Passagen der Biopsie 1 mit unverdickter LP nachgewiesen werden (Abb. 23E-H). Allerdings wies die Calponin-Färbung einen Unterschied zu SMA auf. Einige wenige Zellen in jeder untersuchten Passage P3 bis P6 waren Calponin-negativ, was durch eine fehlende grüne Färbung, aber eine vorhandene blaue Zellkernfärbung, erkennbar war [siehe Stern (\*) in Abb. 23E-H, s.a. Abb. 24C]. Dies könnte vor dem Hintergrund, dass Calponin im Vergleich zu SMA als Marker für mehr differenzierte Zellen gilt (di Gioia *et al.*, 2000), verstehbar sein.

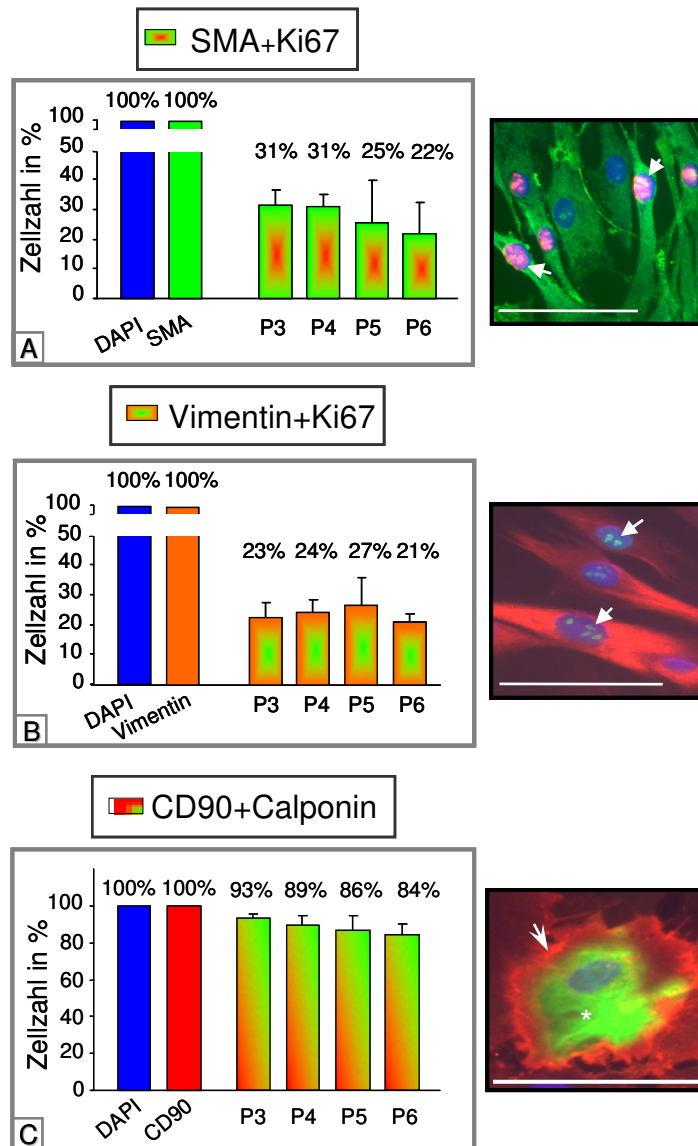
Die Antikörper Vimentin und CD90 färben Fibroblasten an und waren ebenfalls in isolierten Zellen nachweisbar. Vimentin-Färbung ist im Cytoplasma der Zellen zu finden. Bei CD90 handelt es sich um ein Membranprotein. Dies erklärt die membranakzentuierte Färbung (siehe weiße Pfeilspitzen in Abb. 23M-P). Das Fluoreszenz-Signal von CD90 war bei einigen Zellen stärker ausgeprägt als bei anderen. Alle Zellen, welche durch den Kernfarbstoff DAPI blau gekennzeichnet wurden, waren sowohl Vimentin<sup>+</sup> (Abb. 23I-L) als auch CD90<sup>+</sup> (Abb. 23M-P).

Die Anfärbung mit Muskelzell- und Bindegewebsmarkern legte einen Myofibroblasten-Phänotyp der Zellen nahe. Zur Bestätigung der Kolokalisation von Muskelzell- und

Bindegewebsmarkern wurden Doppelfärbungen in einer Zelle durchgeführt. In den Abbildungen 23Q-T war eine Kolokalisierung von CD90 und Calponin feststellbar. Jedoch ließ sich diese Kolokalisierung nicht für alle durch DAPI gekennzeichneten Zellen nachweisen, da einige wenige Zellen [durch einen Stern (\*) markiert] Calponin-negativ (Abb. 23E-H), aber CD90-positiv (Abb. 23M-T) waren.

Um das Zellwachstum und die Zellteilung der kultivierten Zellen beurteilen zu können, wurde ein Antikörper-Nachweis mit dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Eine Ki67<sup>+</sup>-Färbung zeigte sich darin, dass der Kern neben der DAPI-Markierung gleichzeitig noch einen roten (Abb. 23U-X) bzw. einen grünen (Abb. 23Y-Ba) Farbstoff aufwies. Zellteilungen waren in allen untersuchten Passagen P3 bis P6 zu beobachten. Jedoch teilten sich nicht alle Zellen, sondern nur eine Subpopulation. Auffällig war, dass der Muskelzellmarker SMA und der Bindegewebsmarker Vimentin auch in sich teilenden (Ki67<sup>+</sup>) Zellen regelmäßig stark exprimiert waren.

Eine prozentuale Auswertung der Antikörper-Färbungen erfolgte in Abbildung 24.



**Abb. 24: Quantitative Auswertung der Ki67-positiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der unverdickten LP (Biopsie 1)**

A, links: Prozentualer Anteil der SMA<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den SMA<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. B, links: Prozentualer Anteil der Vimentin<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den Vimentin<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. A-B, rechts: Exemplarische Immunfärbung Ki67<sup>+</sup>-Zellen (mit Pfeil markiert). C, links: Prozentualer Anteil der CD90<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Calponin<sup>+</sup>-Zellen an den CD90<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. C, rechts: Beispiel der Kolokalisierung von CD90 (mit Pfeil markiert) und Calponin (mit Stern \* markiert). A-C, rechts: Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an.

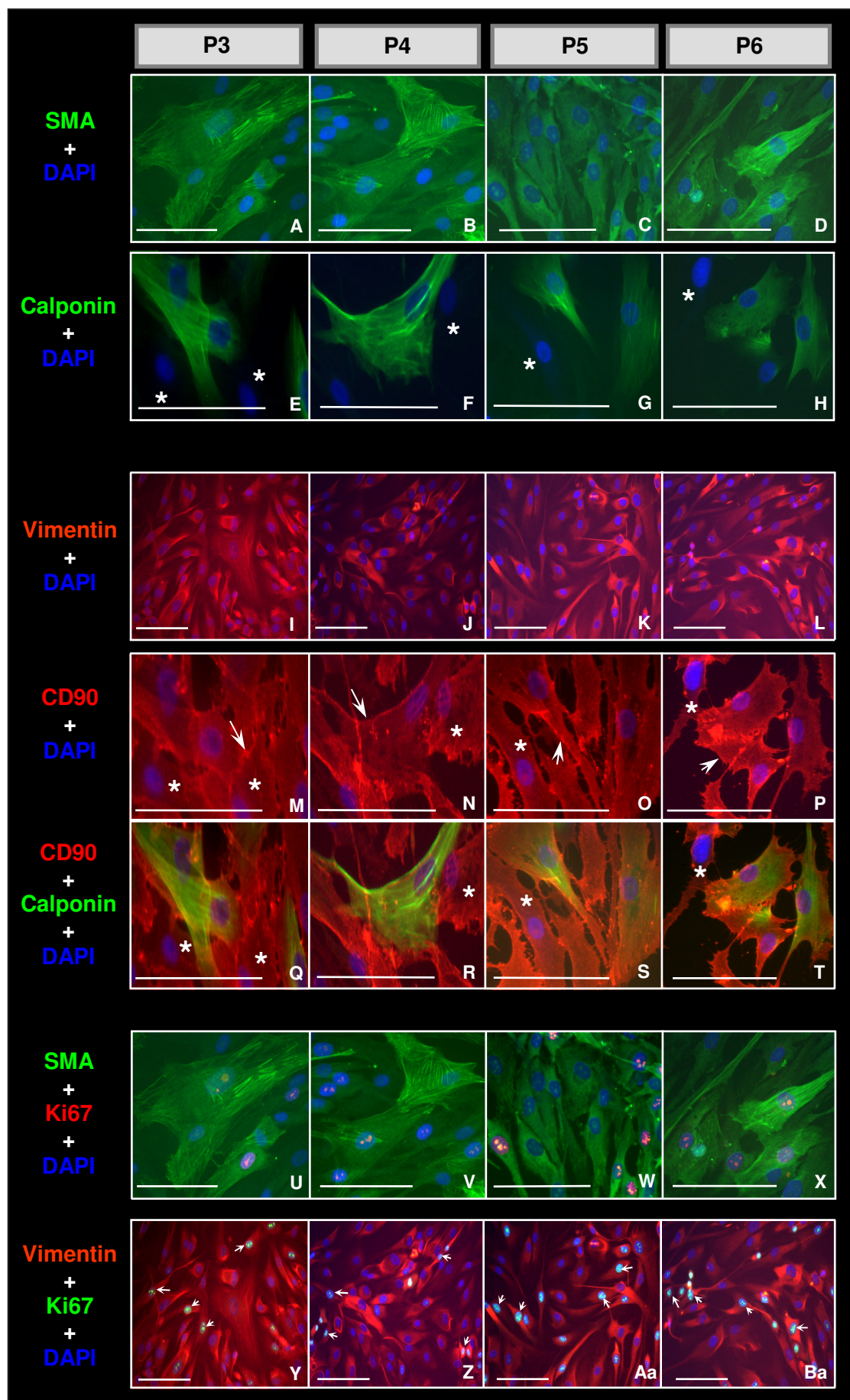
In allen Zellen, welche durch den Kernfarbstoff DAPI blau gekennzeichnet waren, konnten, wie zuvor erwähnt (Abb. 23), der Muskelzellmarker SMA und die Bindegewebsmarker Vimentin sowie CD90 nachgewiesen werden. Diese Antikörperfärbungen wurden in der Prozentualen Auswertung 100% gesetzt (Abb. 24A-C, jeweils die ersten beiden Balken).

Wie beschrieben (Abb. 24U-Ba) zeigte der Proliferationsmarker Ki67 von P3 bis P6 teilungsaktive Zellen. Die Teilungsrate wurde sowohl in der Doppelfärbung mit dem kontraktilen Marker SMA als auch dem Bindegewebsmarker Vimentin ermittelt. Alle Zellen waren SMA<sup>+</sup> und Vimentin<sup>+</sup>, aber nicht alle Zellen teilten sich zur gleichen Zeit. Die Proliferationsrate aller Zellen lag regelmäßig zwischen 22 und 31% in den untersuchten Passagen 3 bis 6. Ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test,  $p < 0,05$ ) zwischen den Passagen konnte nicht festgestellt werden. Die Teilungsrate der Zellen war jedoch bei beiden Ki67-Färbungen in Passage 6 am niedrigsten (SMA+Ki67: 22%, Vimentin+Ki67: 21%, Abb. 18A-B).

In Abbildung 24C waren alle durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) identifizierten Zellen CD90<sup>+</sup> und mehr als 80% der Zellen waren gleichzeitig Calponin<sup>+</sup> (Abb. 23I-T und Abb. 24C). Die CD90<sup>+</sup>-Zellen wurden wie zuvor beschrieben ebenfalls 100% gesetzt. Ein signifikanter Unterschied durch den Mann-Whitney-Test ( $p < 0,05$ ) zwischen P3 bis P6 konnte nicht festgestellt werden.

Die Zellen der zweiten Biopsie mit unverdickter LP (Abb. 16C-D) wurden nach dem gleichen Prinzip mit denselben Antikörpern gefärbt und ausgewertet.





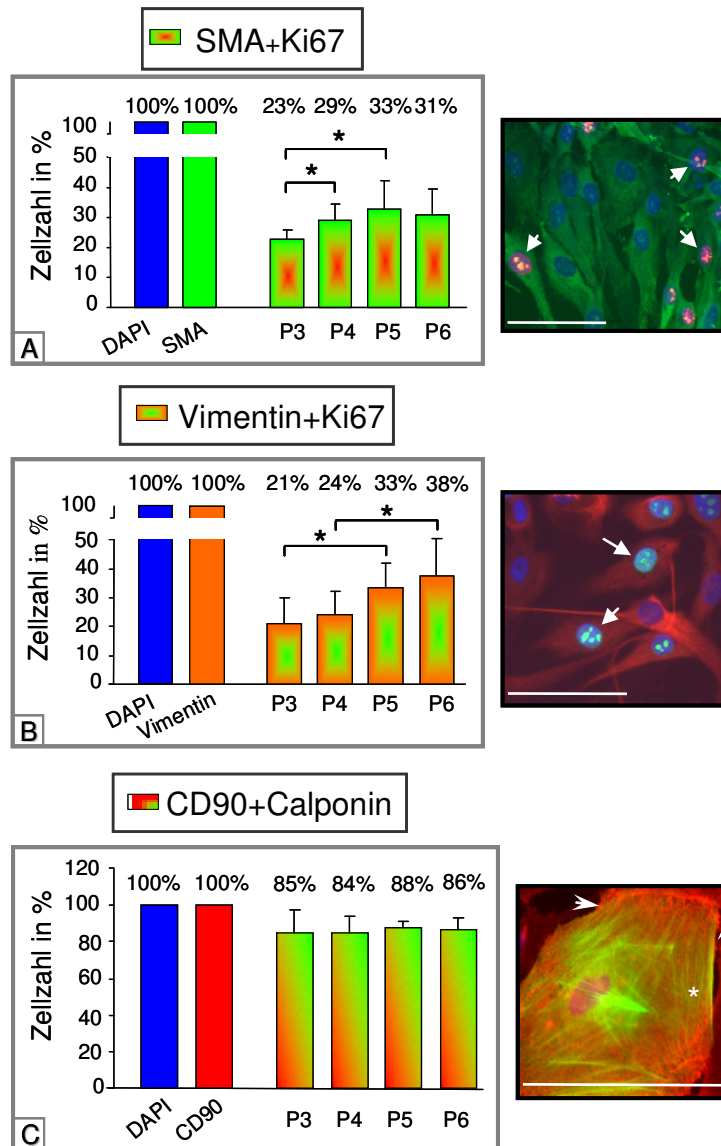
**Abb. 25: Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen der unverdickten LP (Biopsie 2)**

A-Ba: Immunhistochemische Färbung von peritubulären Zellen mit verschiedenen Antikörpern. Alle Zellen können durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Färbung) identifiziert werden. Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an. A-D: SMA-positive (+) Färbung (grün) der Zellen. E-H: Zellen, welche das kontraktile Protein Calponin exprimieren, wurden durch eine grüne Immunfluoreszenz charakterisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen hin. I-L: Die rote Immunfluoreszenz stellt Vimentin<sup>+</sup>-Zellen dar. M-P: CD90<sup>+</sup>-Zellen werden ebenfalls durch eine rote Fluoreszenzfärbung dargestellt. Der Bindegewebsmarker CD90 wird in Zellmembranen exprimiert (weißer Pfeil). Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative (E-H), aber CD90-positive Zellen hin. Q-T: Eine Kolokalisierung von CD90 und Calponin wird durch die Überlagerung von rot und grün im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen (E-H), aber CD90<sup>+</sup>-Zellen (M-P) hin. U-X: Gleichzeitige Darstellung von grüner Färbung (SMA<sup>+</sup>) des Cytoskeletts und roter Kernfärbung, welche den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert. Y-Ba: Überlagerung von roter Fluoreszenz (Vimentin<sup>+</sup>) und grüner Kernfärbung, welche ebenfalls den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert.

Wie zuvor für Biopsie 1 (Abb. 23) ausführlich beschrieben, waren auch der kontraktile Marker SMA (grüne Fluoreszenzfärbung, Abb. 25A-D) sowie die Bindegewebsmarker Vimentin (rote Fluoreszenzfärbung, Abb. 25I-L) und CD90 (rote Fluoreszenzfärbung, Abb. 25M-T) in allen kultivierten Zellen der Biopsie 2 exprimiert. Dieses Phänomen war von Passage 3 bis 6 nachweisbar. Die Zellen konnten abermals eindeutig durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) identifiziert werden. Durch Auszählung der immunpositiven Zellen in Abb. 26A-C wurde diese Beobachtung bestätigt.

Eine Kolokalisation von Calponin und dem Bindegewebsmarker CD90 konnte durch Doppelfärbung beider Antikörper ebenfalls in Zellen der Biopsie 2 gezeigt werden (Abb. 25Q-T), wobei nicht alle Zellen Calponin<sup>+</sup> [Calponin<sup>-</sup>-Zelle durch einen Stern (\*) markiert] waren.

Die Teilungsrate der Zellen konnte, wie zuvor beschrieben (Abb. 23-24), mit dem Proliferationsmarker Ki67 ermittelt werden. In Verbindung mit SMA zeigte Ki67 eine rote Färbung (Abb. 25U-X) und mit Vimentin eine grüne Färbung (Abb. 25Y-Ba) im Kern. Abermals war nur ein Teil der Zellen gleichzeitig teilungsaktiv von P3 bis P6.



**Abb. 26: Quantitative Auswertung der Ki67-positiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der unverdickten LP (Biopsie 2)**

A, links: Prozentualer Anteil der SMA<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den SMA<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. B, links: Prozentualer Anteil der Vimentin<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den Vimentin<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. A-B, rechts: Exemplarische Immunfärbung Ki67<sup>+</sup>-Zellen (mit Pfeil markiert). C, links: Prozentualer Anteil der CD90<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Calponin<sup>+</sup>-Zellen an den CD90<sup>+</sup>-Zellen in P3 bis P6. C, rechts: Beispiel der Kolokalisierung von CD90 (mit Pfeil markiert) und Calponin (mit Stern \* markiert). A-C, rechts: Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an.

Da alle durch DAPI identifizierten Zellen der Biopsie 2 (unverdickte LP) ebenfalls positiv für den kontraktile Marker SMA als auch für die Bindegewebsmarker Vimentin und CD90 waren, wurden diese Marker in der Auswertung 100% gesetzt (die ersten beiden Säulen, Abb. 26A-C). Wie zuvor beschrieben (Abb. 24A-B) wurde die Teilungsrate der Zellen von P3 bis P6 mit dem Proliferationsmarker Ki67 (weißer Pfeil, Abb. 26A) ausgewertet. Im Gegensatz

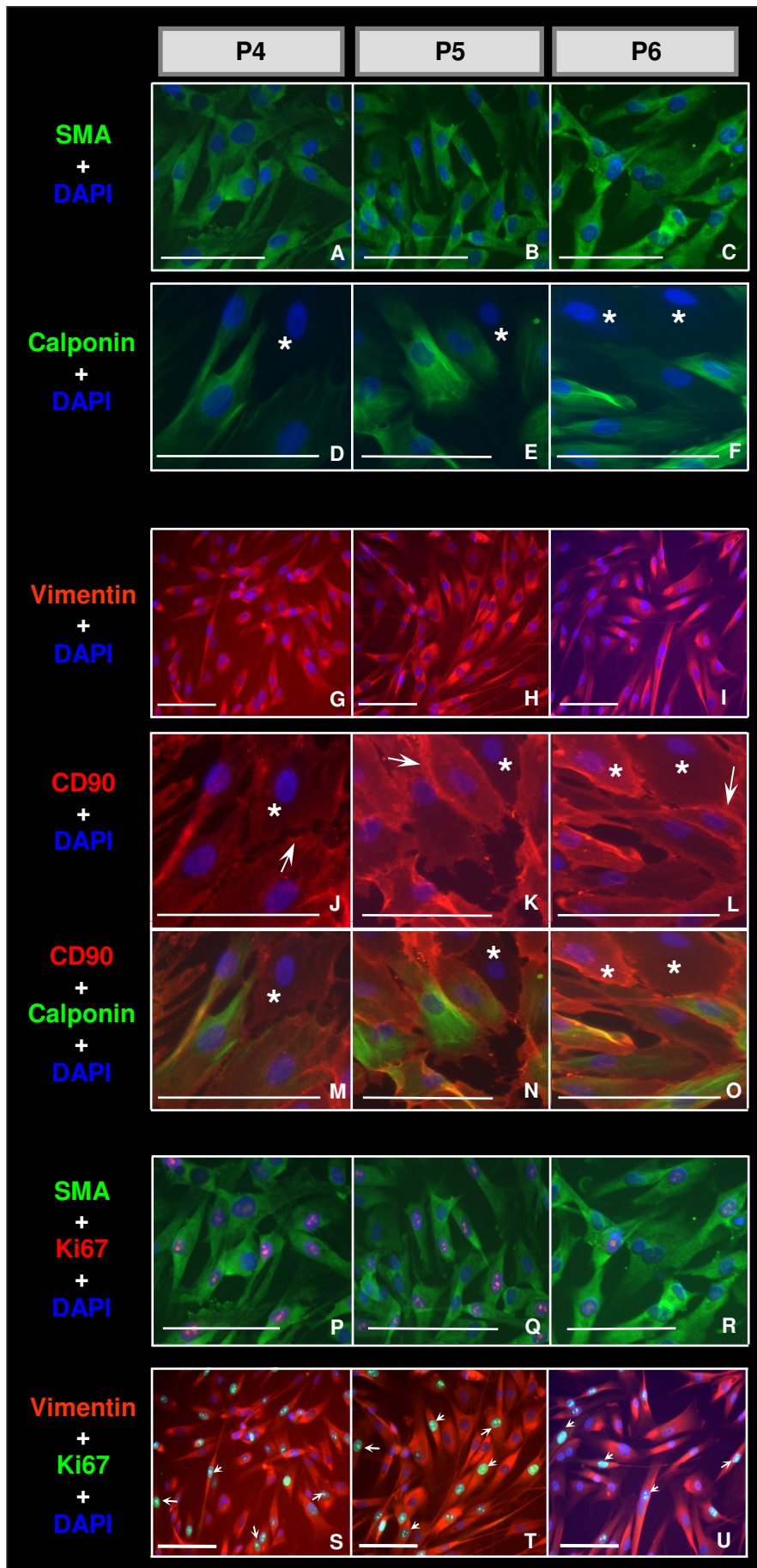


zu den Zellen der Biopsie 1, deren Teilungsaktivität von P3 (31%) bis P6 (22%) leicht abnahm (Abb. 24A), stieg die Proliferation der Zellen von Biopsie 2 von P3 (23%) nach P6 (31%) an (Abb. 26A). Zwischen den Passagen 3 und 4 wurde ein signifikanter Unterschied von  $p=0,0152$  (Mann-Whitney-Test) und zwischen P3 und P5 ein signifikanter Unterschied von  $p=0,041$  (Mann-Whitney-Test) festgestellt.

In Verbindung mit dem Bindegewebsmarker Vimentin zeigte Ki67 (weißer Pfeil, Abb. 26B) ebenfalls einer Erhöhung der teilungsaktiven Zellen von P3 (21%) nach P6 (38%). Ein signifikanter Effekt von Ki67 zwischen P3 und P5 ( $p=0,026$ , Mann-Whitney-Test) und zwischen P4 und P6 ( $p=0,026$ , Mann-Whitney-Test) wurde festgestellt.

Wie zuvor beschrieben (Abb. 24C), wurden CD90<sup>+</sup>-Zellen, welche durch DAPI gekennzeichnet waren, 100% gesetzt. Die Menge der CD90+Calponin-koexprimierenden Zellen (Abb. 26C) schwankte zwischen 84-88% und ähnelte der Menge an ausgezählten CD90+Calponin-positiven Zellen der Biopsie 1 (84-93%). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Passagen von P3 bis P6 konnte nicht festgestellt werden.

Auch bei kultivierten Zellen der verdickten LP (Biopsie 3) wurden Antikörper gegen die Muskelzellmarker SMA und Calponin als auch die Bindegewebsmarker Vimentin und CD90 verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen wurden bei Zellen der verdickten LP routinemäßig an den Passagen 4 bis 6 durchgeführt.



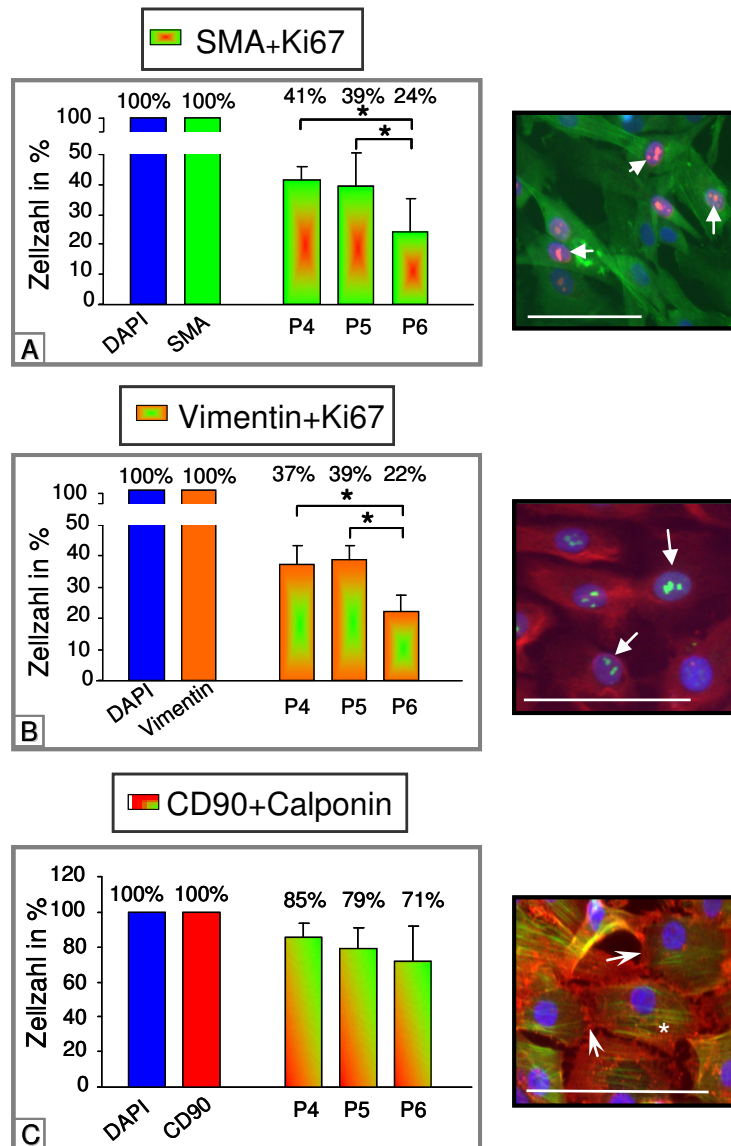
**Abb. 27: Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen von Biopsie 3 (verdickte LP)**

A-U: Immunhistochemische Färbung von peritubulären Zellen mit verschiedenen Antikörpern. Alle Zellen können durch den Kernfarbstoff DAPI (blaue Färbung) identifiziert werden. Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an. A-C: SMA-positive (+) Färbung (grün) der Zellen. D-F: Zellen, welche das kontraktile Protein Calponin exprimieren, wurden durch eine grüne Immunfluoreszenz charakterisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen hin. G-I: Die rote Immunfluoreszenz stellt Vimentin<sup>+</sup>-Zellen dar. J-L: CD90<sup>+</sup>-Zellen werden ebenfalls durch eine rote Fluoreszenzfärbung dargestellt. Der Bindegewebsmarker CD90 wird in Zellmembranen exprimiert (weißer Pfeil). Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative (D-F), aber CD90-positive Zellen hin. M-O: Eine Kolokalisierung von CD90 und Calponin wird durch die Überlagerung von rot und grün im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Der Stern (\*) weist auf Calponin-negative Zellen (D-F), aber CD90<sup>+</sup>-Zellen (J-O) hin. P-R: Überlagerung von grüner Färbung (SMA<sup>+</sup>) des Cytoskeletts und roter Kernfärbung, welche den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert. S-U: Gleichzeitige Darstellung von roter Fluoreszenz (Vimentin<sup>+</sup>) und grüner Kernfärbung, welche ebenfalls den Proliferationsmarker Ki67 repräsentiert.

Wie bei Zellen der unverdickten LP beschrieben (Abb.23 und 25) wiesen alle isolierten Zellen der verdickten LP, welche durch DAPI blau markiert wurden, eine SMA<sup>+</sup>-Färbung auf (grüne Fluoreszenz, Abb. 27A-C). Dies deutet drauf hin, dass isolierte Zellen einen Muskelzell-Phänotyp in Kultur aufweisen unabhängig vom ursprünglichen (pathologischen) Zustand der Lamina propria. In diesem Zusammenhang erscheint die Untersuchung weiterer Biopsien mit verschiedener LP-Morphologie sinnvoll.

Calponin (grüne Fluoreszenz, Abb. 27D-F) als kontraktiler Marker konnte auch bei Zellen der verdickten LP nachgewiesen werden. Auch hier exprimierten die meisten Zellen Calponin. Welchen Anteil Calponin<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtzahl haben, wird in Abb. 28 prozentual dargestellt.

In allen Zellen war ebenfalls eine positive Färbung mit den Antikörpern gegen die Bindegewebsmarker Vimentin (Abb. 27G-I) und CD90 (Abb. 27J-O) zu finden. Alle Zellen wurden durch den Kernfarbstoff DAPI eindeutig identifiziert. Eine überwiegende Kolokalisation durch den Bindegewebsmarker CD90 und den Muskelzellmarker Calponin konnte bestätigt werden (Abb. 27M-O) und kennzeichnet einen Myofibroblasten-Phänotyp, welcher auch bei Zellen der verdickten LP in Kultur ausgeprägt ist. Die Kolokalisation konnte wiederum nicht für jede Zelle gezeigt werden, da zwar jede durch DAPI markierte Zelle CD90<sup>+</sup> (Abb. 27J-O), aber nur ein Teil der Zellen Calponin<sup>+</sup> (Abb. 27D-F) war.



**Abb. 28: Quantitative Auswertung der Ki67-positiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der verdickten LP (Biopsie 3)**

A, links: Prozentualer Anteil der SMA<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den SMA<sup>+</sup>-Zellen in P4 bis P6. B, links: Prozentualer Anteil der Vimentin<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Zellen an den Vimentin<sup>+</sup>-Zellen in P4 bis P6. A-B, rechts: Exemplarische Immunfärbung Ki67<sup>+</sup>-Zellen (mit Pfeil markiert). C, links: Prozentualer Anteil der CD90<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen (DAPI<sup>+</sup>) und Prozentualer Anteil der Calponin<sup>+</sup>-Zellen an den CD90<sup>+</sup>-Zellen in P4 bis P6. C, rechts: Beispiel der Kolokalisierung von CD90 (mit Pfeil markiert) und Calponin (mit Stern \* markiert) Zelle. A-C, rechts: Die Balken geben einen Maßstab von 100µm an.

Die Teilungsrate der Zellen wurde ebenfalls mit dem Proliferationsmarker Ki67 in Verbindung mit SMA (rote Kernfluoreszenz, Abb. 27P-R) und mit Vimentin (grüne Kernfluoreszenz, Abb. 28S-U) ermittelt. Die Proliferation der Zellen in Kombination mit SMA zeigte eine leichte Abnahme von P4 (41%) nach P6 (24%) sowie zwischen P5 (39%) und P6(24%) (Abb. 28A). Es konnte ein signifikanter Unterschied (Man-Whitney-Test)

zwischen P4 und P6 ( $p=0,0411$ ) und zwischen P5 und P6 ( $p=0,0411$ ) verzeichnet werden (Abb. 22A). Eine ähnliche Teilungsaktivität konnte auch in Verbindung mit Vimentin+Ki67 beobachtet werden (Abb. 28B). Die Proliferation nahm von P4 (37%) nach P6 (22%) sowie P5 (39%) nach P6 (22%) ab. Ein signifikanter Unterschied (Man-Whitney-Test) trat ebenfalls zwischen den Passagen P4 und P6 ( $p=0,022$ ) und P5 und P6 ( $p=0,022$ ) auf.

Der Anteil der CD90+Calponin-positiven Zellen ist prozentual geringer bei den Zellen der verdickten LP als bei denen der unverdickten LP (Biopsie 1 (nLP): CD90+Calponin: 84-93%, Abb. 24C; Biopsie 2 (nLP): CD90+Calponin: 84-88%, Abb. 26C; Biopsie 3 (vLP): CD90+Calponin: 71-85%, Abb. 28C).

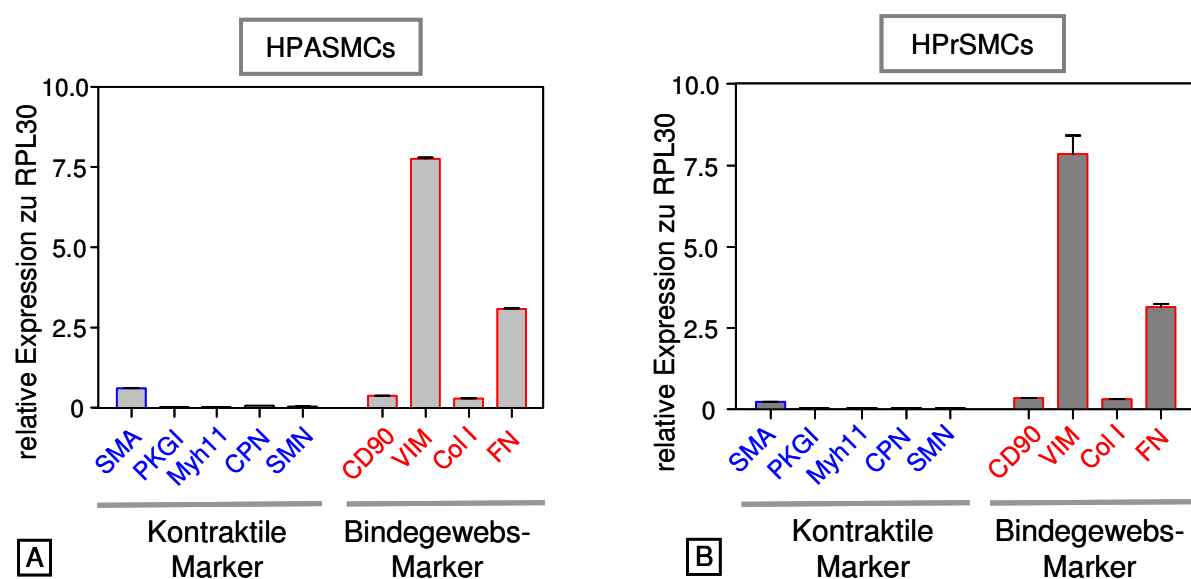
#### 4.1.11 Genexpressionsanalysen spezifischer kontraktile und Bindegewebsmarker in kultivierten, klassischen Muskelzellen

Die höhere Expression von Bindegewebsmarkern wie Vimentin und Fibronectin gegenüber kontraktile Markern (SMA, PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) sowohl in der unverdickten als auch der verdickten LP war ein interessantes Ergebnis. Um zu überprüfen, ob auch in klassischen Muskelzellen die Expression von Bindegewebsmarkern höher ist im Vergleich zu Muskelzellmarkern, haben wir Genexpressionsanalysen der zuvor verwendeten Marker (Abb. 18-20) an humanen, kultivierten Muskelzellen der Lungenarterie (HPASMCs) und Prostata (HPrSMCs) im Vergleich zu den peritubulären Zellen durchgeführt.

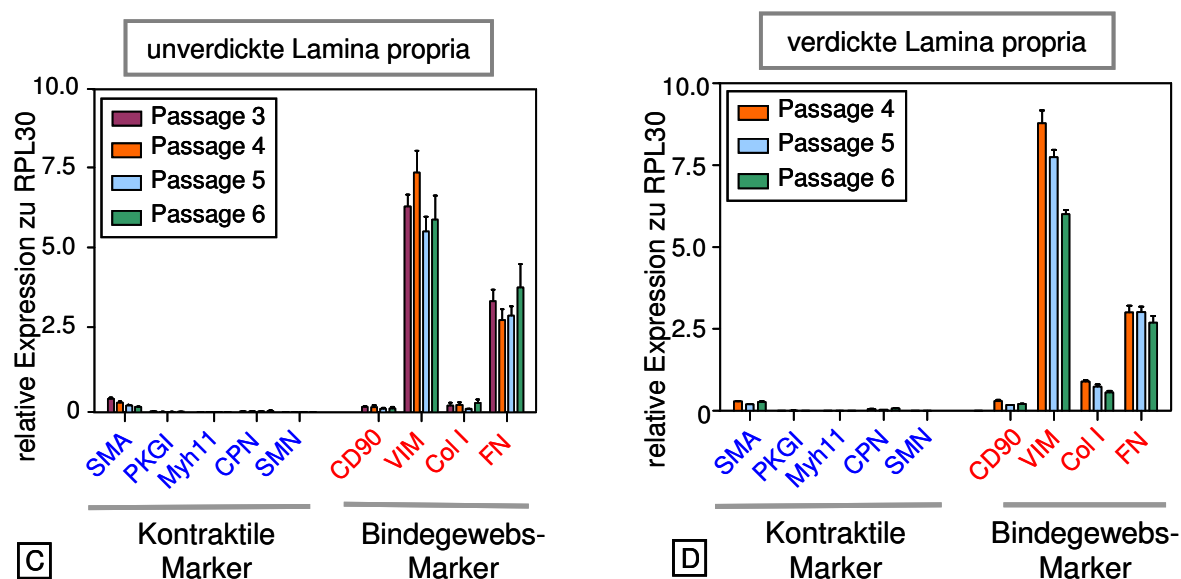
Beide Primärzell-Linien (HPASMCs und HPrSMCs) wurden von PromoCell (Heidelberg) erworben. Laut Herstellerangaben wurden die Zellen mit immunhistochemischen Untersuchungen positiv auf die Expression des Proteins SMA und negativ auf den Bindegewebsmarker CD90 geprüft.

Nun soll durch Quantifizierung von kontraktile und Bindegewebsmarkern mit der  $\Delta C_t$ -Methode in klassischen Muskelzellen (HPASMCs und HPrSMCs) geklärt werden, ob die zuvor beschriebene hohe Expression von Vimentin und Fibronectin ein spezifisches Merkmal für die peritubulären Zellen der LP, die in der Literatur auch als Myofibroblasten beschrieben werden (Holstein *et al.* 1996), sein könnte. Die Expression jedes Gens wurde auf den internen Standard RPL30 bezogen. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden fünf Versuche unabhängig voneinander durchgeführt, die Mittelwerte bestimmt und daraus die Standardabweichung berechnet.

### klassische Muskelzellen



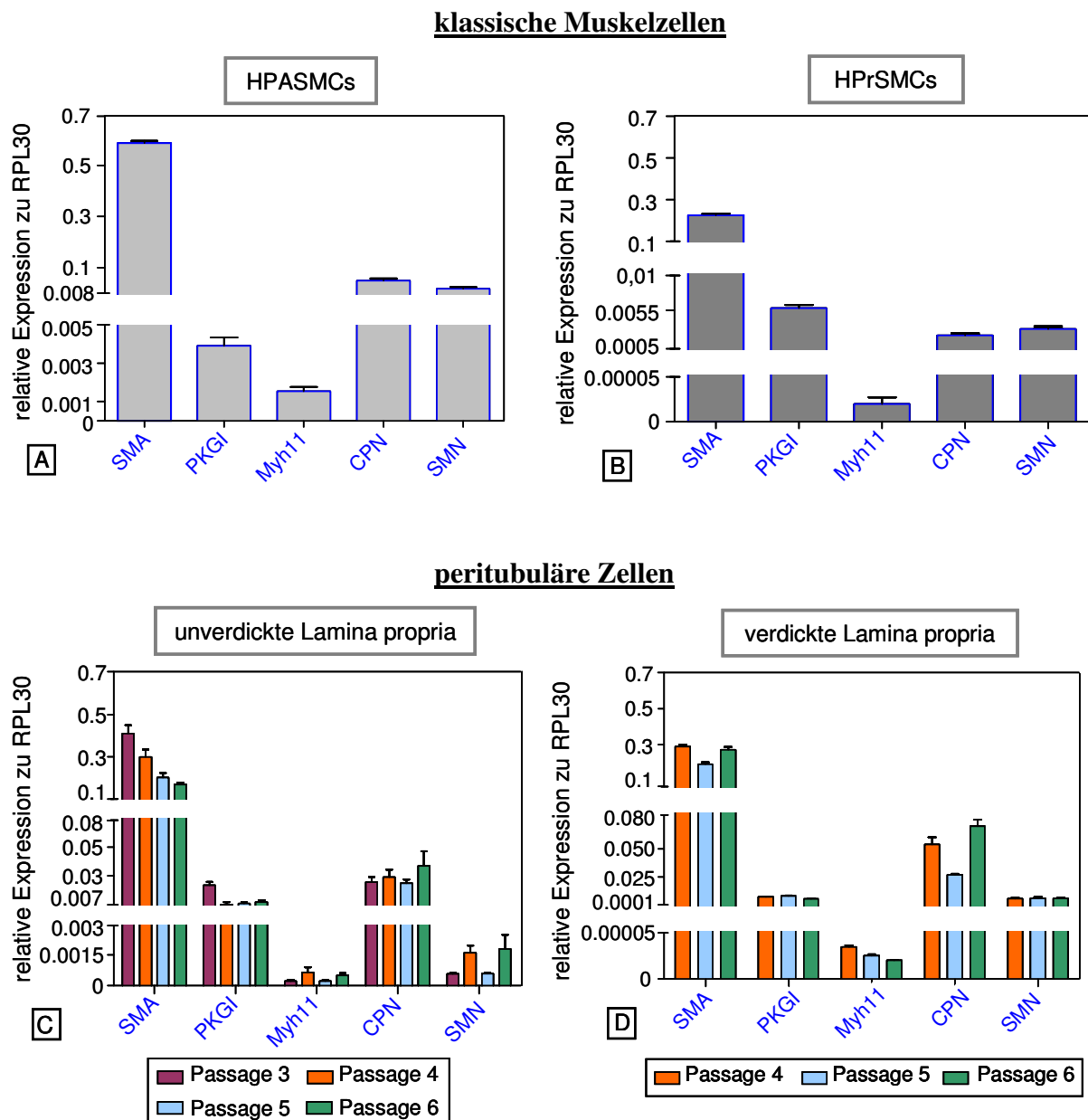
### peritubuläre Zellen



**Abb. 29: Vergleich von klassischen Muskelzellen mit peritubulären Zellen**

A-D: Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta$ Ct-Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. Kontraktile Marker [SMA, PKGI, Myh11, CPN, SMN, blau markiert] wurden im Vergleich zu Bindegewebsmarkern [CD90, Vim, Col I, FN, rot markiert] in klassischen Muskelzellen der Lungenarterie (A: HPASMCs) und der Prostata (B: HPrSMCs) und in peritubulären Zellen (C: unverdickte und D: verdickte LP) dargestellt. Für die HPASMCs und HPrSMCs wurden die Passagen 9 bzw. 4 genutzt. Die relative Expression der Markergene ist für die Ergebnisse der peritubulären Zellen in mehreren Passagen gezeigt, welche farblich markiert wurden (Bildlegende). Bei Proben mit unverdickter LP (C) wurden 6 unabhängige Versuche pro Passage und bei der Probe mit verdickter LP (D) 3 unabhängige Versuche pro Passage zusammengefasst. In allen Versuchen erfolgten die Real-Time-Messungen in Triplikaten.

Überraschenderweise erhielten wir ein vergleichbares Expressionsmuster der kontraktilen (SMA, PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) und der Bindegewebsmarker (CD90, Vimentin, Kollagen I, Fibronectin) in Zellen der HPASMCs und HPrSMCs wie in kultivierten peritubulären Zellen (Abb. 29). Die relative Expression der Bindegewebsmarker Vimentin (VIM) und Fibronectin (FN) überwiegt interessanterweise auch in humanen Muskelzellen der Pulmonalarterie (Abb. 29A) und der Prostata (Abb. 29B) und ist vergleichbar mit den Daten der peritubulären Zellen von unverdickter und verdickter LP (Abb. 29C-D). Bezogen auf das Housekeeping-Gen RPL30 waren die Bindegewebsmarker CD90 und KollagenI sowie der kontraktile Marker SMA vergleichbar hoch exprimiert in allen Muskelzellen, jedoch deutlich schwächer als Vimentin und Fibronectin. Das Expressionsniveau der weiteren kontraktilen Marker (PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) war bezogen auf die RPL30-Expression in HPASMCs und HPrSMCs geringer als das der übrigen Marker, sodass eine separate Darstellung mit gespreizter Skalierung gewählt wurde (Abb. 30).



**Abb. 30: mRNA-Expression kontraktile Marker in HPASMCs und HPrSMCs**

A-B: Vergleichende Darstellung der relativen mRNA-Mengen der kontraktile Marker (SMA, PKGI, Myh11, CPN, SMN) mit vergrößerter Skalierung. Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta C_t$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. A: Relative Expression der kontraktile Marker bezogen auf RPL30 in kultivierten HPASMCs. B: Relative Expression der kontraktile Marker bezogen auf RPL30 in kultivierten HPrSMCs.

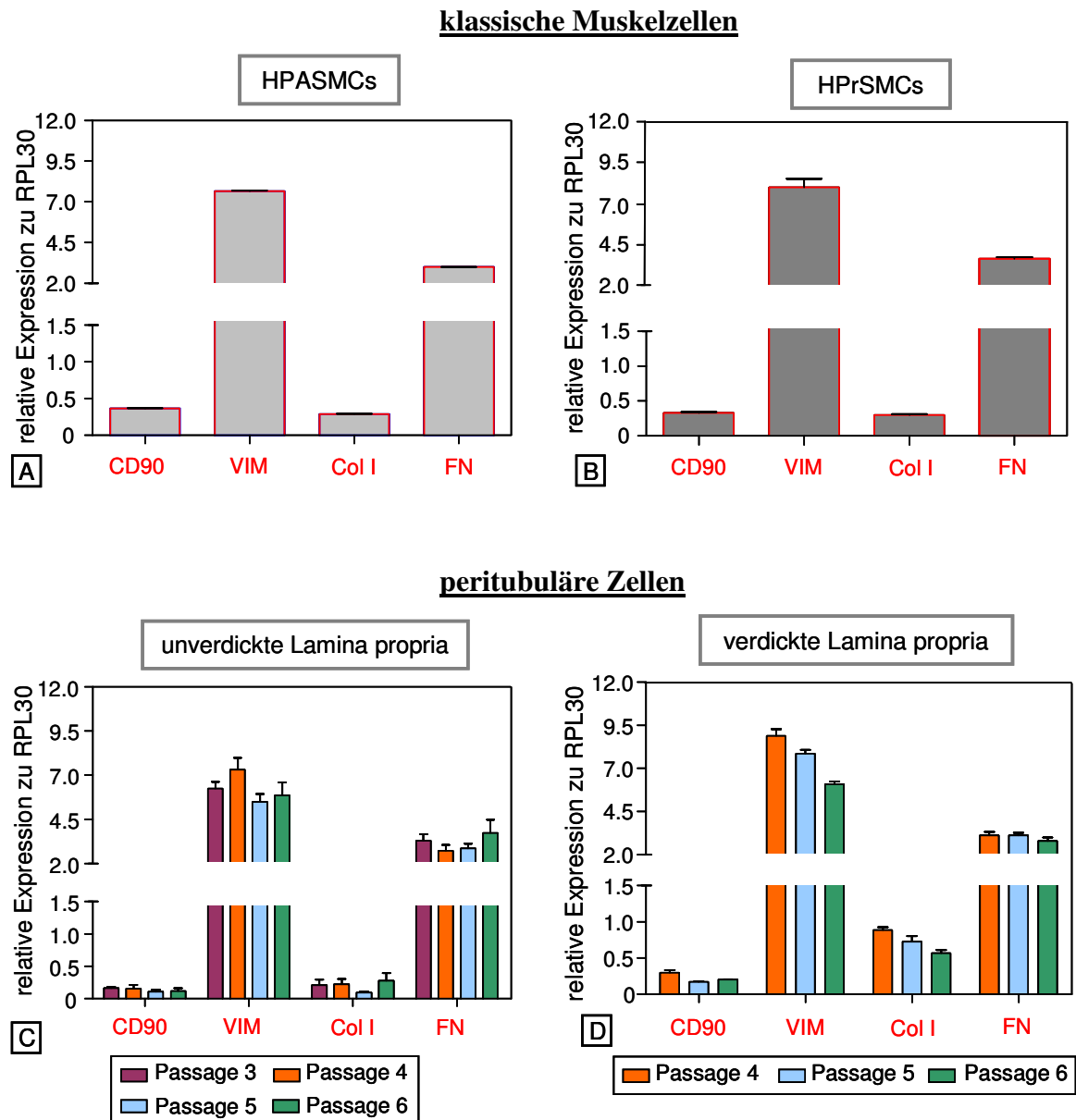
Das Expressionsmuster war zwischen den einzelnen Zellen (LP-Zellen, HPASMCs, HPrSMCs) vergleichbar. SMA war in allen untersuchten Zellen der dominante kontraktile Marker. SMA ist signifikant höher in HPASMCs ( $p=0,0079$ ; Man-Whitney-Test) als in HPrSMCs exprimiert. Der Transkriptspiegel von Myh11 war in allen untersuchten Zellen am



niedrigsten. Dennoch war die relative Expression von Myh11 signifikant höher in HPASMCs ( $p=0,0079$ ; Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu HPrSMCs.

Im Vergleich zum Transkriptlevel in HPrSMCs war die Expression folgender kontraktile Marker, nämlich SMA, Myh11, Calponin, Smoothelin, durchgehend stärker in HPASMCs.

Die Expressionsunterschiede zwischen den klassischen Muskelzellen und den isolierten LP-Zellen sind sehr gering.



**Abb. 31: mRNA-Expression von Bindegewebsmarkern in HPASMCs und HPrSMCs**

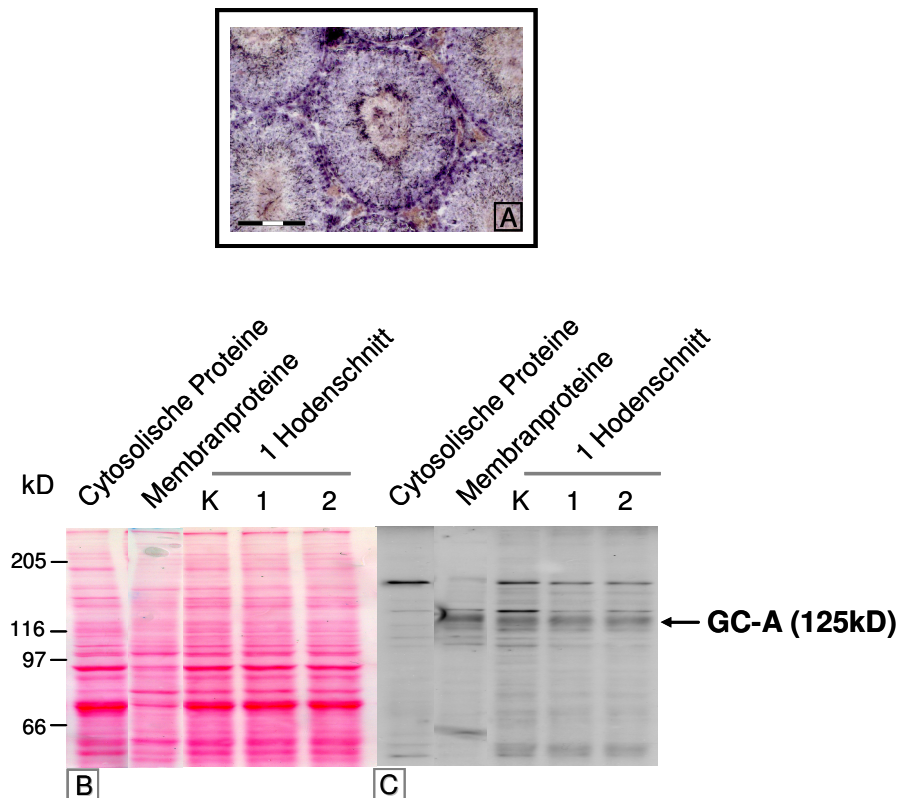
A-B: Vergleichende Darstellung der relativen mRNA-Mengen der verwendeten Bindegewebsmarker (CD90, Vimentin, KollagenI, Fibronectin) mit vergrößerter Skalierung. Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta C_t$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen RPL30 normiert. A: Relative Expression der Bindegewebsmarker bezogen auf RPL30 in kultivierten HPASMCs. B: Relative Expression der Bindegewebsmarker bezogen auf RPL30 in kultivierten HPrSMCs.

Die hier verwendeten Bindegewebsmarker zeigten keine signifikanten Unterschiede auf mRNA-Ebene zwischen HPASMCs und HPrSMCs. Auch im Vergleich mit peritubulären Zellen war das Expressionsmuster vergleichbar. Wie zuvor bereits erwähnt (s.o., Abb. 28A-B), waren die Bindegewebsmarker Vimentin und Fibronectin nicht nur die dominierenden Transkripte in HPASMCs und HPrSMCs, sondern auch in peritubulären Zellen (Abb. 18A-B und 28C-D).

#### 4.1.12 Etablierung der Laser-Capture-Mikrodissektion zum Nachweis von Proteinen mittels Western Blot am Beispiel des cGMP- produzierenden Membranproteins GC-A im Rattenhoden

Die Technologie der LCM eröffnete die Möglichkeit zelluläre Areale berührungsfrei aus heterogenem Gewebe zu isolieren. Bereits eine geringe Ausgangsmenge an Zellmaterial reicht aus, um mit RT-PCR DNA zu amplifizieren und mit spezifischen Primern ausgewählter Genprodukte nachzuweisen. Der Vorteil dieser Methode ist die exakte Lokalisierung von Genexpression in einem Organanteil, wie z.B. der von PDE5A in kontraktilen Zellen der Tubuli seminiferi (Abb. 7).

Proteine können sich im Unterschied zu Nukleinsäuren nicht selbst replizieren. Daher ist es unmöglich, eine Technik wie die PCR anzuwenden, um Proteine in vitro zu vervielfachen. Man muss also eine gewisse Mindestmenge von Proteinen extrahieren, um diese mit einer Methode wie dem Western Blot detektieren zu können. Die Identifizierung eines Proteins gestaltet sich als schwierig, wenn die Expression nur einer besonderen Gruppe von Zellen zugesprochen werden kann, aber die Probe von dem ganzen Organ stammt. Exemplarisch sollte nun der Rezeptor GC-A, der NO-Rezeptor sGC und die zyklische Nukleotid degradierende PDE2A mit der Western Blot-Methode in Laser-mikrodissezierten (Ball *et al.*, 2004) Tubuli seminiferi des Rattenhodens nachgewiesen werden. Zunächst musste die Proteinmenge in der man, z.B. den membranlokalisierten GC-A Rezeptor (Silberbach *et al.*, 2001; Kotlo *et al.*, 2010) detektieren kann, abgeschätzt werden. In einem Vorversuch wurde die Proteinmenge eines kryopräservierten Hodenquerschnittes (10µm Dicke) im Vergleich zu bekannten Proteinmengen bestimmt (Abb. 32).



**Abb. 32: GC-A Nachweis an einem ganzen Hodenschnitt der Ratte**

A: Ausschnitt eines unfixierten Hämatoxylin-gefärbten Hodenquerschnittes (10 μm Dicke) mit einem Durchmesser von ca. 10-13 mm. Der Balken gibt eine Länge von 150 μm an.

B: Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Ponceau-Färbung, um das Proteinmuster darzustellen. C: Das GC-A Protein wurde anschließend mit Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Bei der cytosolischen Fraktion wurden 50 μg Protein und bei der Membranfraktion 40 μg Protein eines Rattenhoden-Homogenats eingesetzt. Der Western Blot zeigte sowohl GC-A-Expression in der Fraktion der Membranproteine als auch den unterschiedlich behandelten Hodenschnitten (K= Kontrolle bei Raumtemperatur (RT) ohne Behandlung, 1= Inkubation bei 37°C, 2= Inkubation mit DNaseI, bei 37°C).

Dabei wurden die bekannte Menge einer cytosolischen Proteinpräparation (40 μg), sowie einer Membranpräparation (50 μg) im Vergleich zu unterschiedlichen Ansätzen von Hodenquerschnitten untersucht. Beide Präparationen wurden aus Hodenproben adulter Ratten mit Ultrazentrifugation des Homogenats gewonnen.

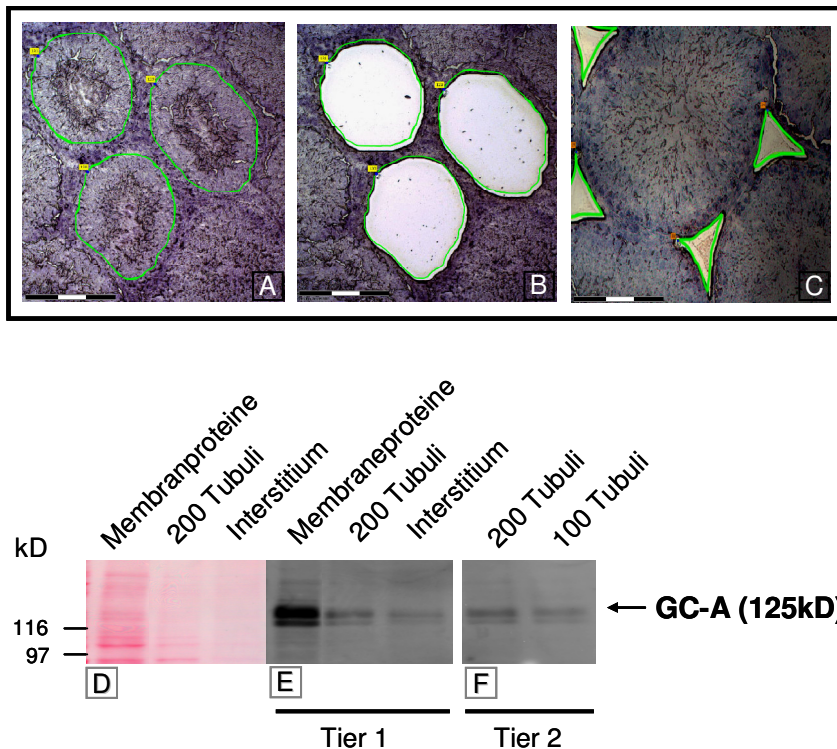
Nukleinsäuren können das Laufverhalten der Proteine in der SDS-Page negativ beeinflussen. Das Enzym DNaseI hydrolysiert störende DNA-Fragmente und arbeitet effektiv bei 37°C (Huang *et al.*, 1996). Die Versuchsansätze setzten sich aus einer Kontrolle (K) bei Raumtemperatur (RT) ohne Behandlung (Abb. 32), einer Probe, welche bei 37°C inkubiert wurde (Abb. 32, Lane 1) und einer Probe, die mit DNaseI bei 37°C für 20 min behandelt wurde (Abb. 32, Lane 2) zusammen. Das Proteinmuster wurde mit der Ponceau-Färbung dargestellt. Die Behandlung mit dem Enzym DNaseI oder die Inkubation bei 37°C

beeinträchtigt das Proteinmuster nicht. Der Vergleich der Bandenstärke konnte einen guten Hinweis auf die Menge an Proteinen geben, die in einem Hodenschnitt enthalten sind. Die Proteine eines Hodenschnittes weisen in etwa die gleiche Bandenintensität wie die Proteine der cytosolischen Fraktion auf. Die Menge der cytosolischen Fraktion ist mit 50µg genau definiert.

Der Blot wurde mit dem spezifischen GC-A-Antikörper behandelt und zeigte sowohl eine Bande in der Membranfraktion, als auch in den Hodenquerschnitten bei der erwarteten Größe von ca. 125kDA. Die Unschärfe der GC-A-Bande deutet auf eine Glykosylierung des Proteins hin. (Muller *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2004). Da der ANP-Rezeptor ein membrangebundenes Protein ist, konnte er nicht in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen werden, welche hier als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die scharfe Bande in Lane K, 1 und 2 (ca. 200kDA) deutet auf ein cytosolisches, unspezifisch markiertes Protein hin, da diese Bande auch deutlich in der cytosolischen Fraktion zu sehen ist.

Als nächster Schritt sollte das GC-A-Protein in Laser-mikrodissezierten Proben nachgewiesen werden. In einem Hodenquerschnitt können bis zu 200 Anschnitte von Tubuli seminiferi (quer und längsgetroffene) vorhanden sein.

Um die Proteinmenge isolierter Tubuli mit der Proteinmenge eines ganzen Hodenquerschnittes vergleichen zu können, wurden Präparationen von 100 bzw. 200 quergetroffenen Tubuli und interstitiellen Arealen (ca. 2000 Areale) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Während der Mikrodissektion kann man im Menü des PALM Micro Beam Systems die Fläche des ausgeschnittenen Zellbereichs angezeigt werden, sodass man sich nicht nur an der Anzahl, sondern vor allem an der Fläche des ausgeschnittenen Materials orientieren konnte. Als Kontrolle wurde die Membranfraktion eines Homogenats mit bekannter Proteinmenge eingesetzt (Abb. 33). Das Protokoll für die Laser-Mikrodissektion erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für mRNA-Untersuchungen. Interessant war hierbei die Frage, ob verschiedene Färbungen oder Fixierungen die Analyse von Proteinen stören. Verschiedene Gruppen konnten bestätigen, dass die Färbung mit Hämatoxylin und die kurze Fixierung von Ethanol keinen Effekt auf die Proteinintegrität ausübt (Banks *et al.*, 1999; Mouledous *et al.*, 2003).



**Abb. 33: GC-A Nachweis in isolierten Arealen (Tubuli und Interstitium) mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion**

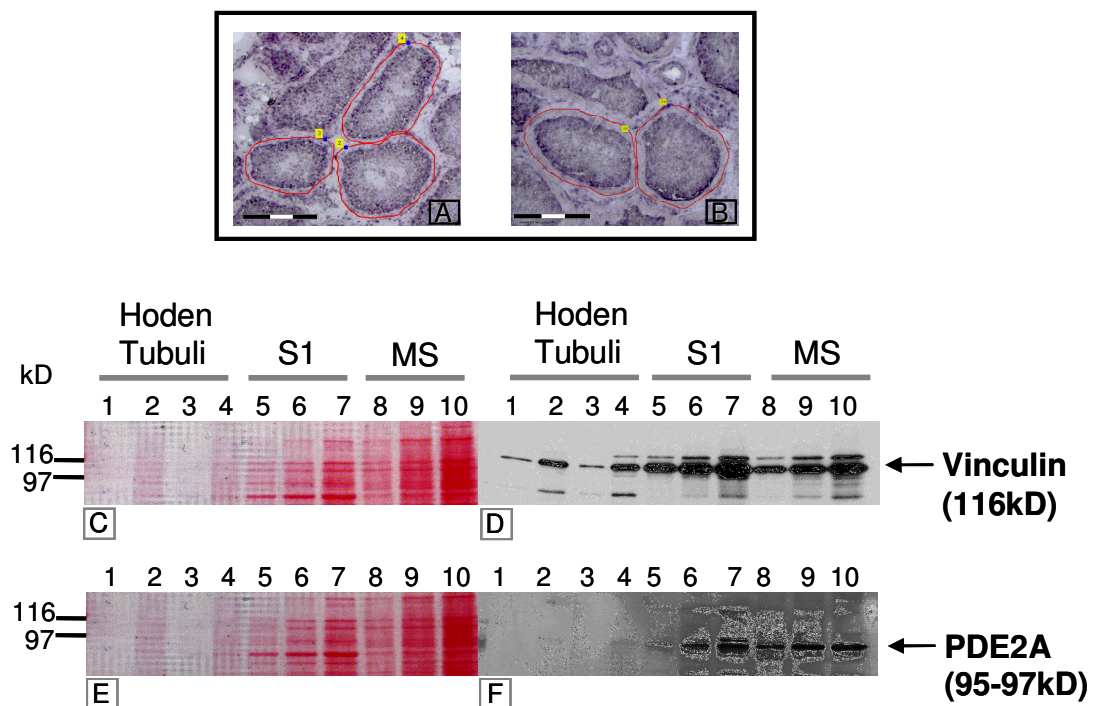
A-C: Mit Hämatoxylin gefärbte unfixierte Schnitte (Dicke=10μm, Durchmesser 10-13mm) vom Rattenhoden vor (A) und nach (B-C) Mikrodissektion von Tubuli seminiferi (B) oder interstitiellen Arealen (C). Der Balken gibt einen Maßstab von 150μm an.

D-F: Membranproteine (20μg) von Hodenhomogenaten wurden im Vergleich zu 200 Tubuli (ca. 2 Mill. μm<sup>2</sup>) und interstitiellen Arealen (ca. 1 Mill. μm<sup>2</sup>) und einer weiteren Präparation von 200 Tubuli (ca. 2 Mill. μm<sup>2</sup>) im Vergleich zu 100 Tubuli (ca. 1 Mill. μm<sup>2</sup>) mittels Western Blot (D: Proteinfärbung, E: Nachweis von GC-A) analysiert. Der ANP-Rezeptor GC-A (125kD) konnte in unabhängigen Präparationen von zwei Tieren (1, 2) nachgewiesen werden (E-F).

Mit Hilfe der Proteinfärbung konnte die Menge in isoliertem Probenmaterial an der definierten Menge der Membranproteine abgeschätzt werden. In 200 Tubuli (ca. 2 Mill. μm<sup>2</sup>) oder interstitiellen Arealen von ca. 1 Mill. μm<sup>2</sup> befinden sich demnach weniger als 20μg Gesamtprotein. Im Western Blot wurden Laser-mikrodissezierte Tubuli-Proben von zwei unterschiedlichen Tieren (Abb. 33E, F), interstielle Areale (Tier 1) und die Membranfraktion einer ganzen Hodenpräparation auf die Expression von GC-A untersucht. Dabei zeigte sich in allen Proben ein Signal bei der erwarteten Größe von 125kDa. Hinsichtlich der Intensität der Bande konnte man klare Unterschiede erkennen. In beiden Proben von 200 Tubuli ist der GC-A-Rezeptor deutlich reduziert gegenüber der Membranfraktion als Kontrolle. Die Bandenintensität des Rezeptors schien nach Analyse von 200 Tubuli zweier verschiedener Tiere gleich stark auszufallen. Die Stärke der GC-A Bande in der Probe mit 100 Tubuli war vermindert gegenüber der Probe mit 200 Tubuli (Abb. 33F).

#### 4.1.13 Nachweis von PDE2A in Laser-mikrodissezierten Tubuli seminiferi des Menschen.

Nachdem in isolierten Tubuli seminiferi des Rattenhodens das Protein GC-A mit Western Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte, wurden nun Untersuchungen auch mit menschlichem Material zum Nachweis cGMP-abhängiger Signalkomponenten durchgeführt. Die Proteinexpression von GC-A in ausgeschnittenen Tubuli seminiferi des Menschen (n=100 und 200 T. seminiferi) war sehr gering, deshalb folgten nun Western Blot-Untersuchungen an humanen isolierten Tubuli seminiferi zur Analyse der Proteinexpression von PDE2A.



**Abb. 34: Nachweis von PDE2A in isolierten ganzen Tubuli seminiferi des Menschen**

A-B: Mit Hämatoxylin gefärbtes unfixiertes Hodengewebe von 2 unterschiedlichen Menschen. C und E: Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Ponceau-Färbung (rotes Bandenmuster). D: Das Strukturproteins Vinculin diente als „Loading control“. F: PDE2A-Expression im Western Blot konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Nach Mikrodissektion von Tubuli (Lane: 1-4) und Homogenisierung von Hodengewebe (Lane: 5-10) wurden folgende Proben mittels Western Blot analysiert:

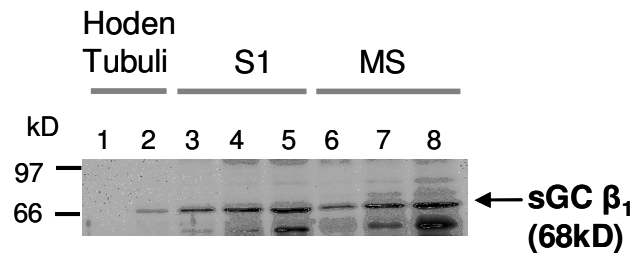
- (1)- 100 Tubuli Hoden, Patient 1 (3,5 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (2)- 200 Tubuli Hoden, Patient 1 (6,5 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (3)- 100 Tubuli Hoden, Patient 2 (3,3 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (4)- 200 Tubuli Hoden, Patient 2 (6,3 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (5)- Cytosolische Fraktion S1 (10 $\mu\text{g}$  Protein)
- (6)- Cytosolische Fraktion S1 (20 $\mu\text{g}$  Protein)
- (7)- Cytosolische Fraktion S1 (40 $\mu\text{g}$  Protein)
- (8)- Membranfraktion MS (10 $\mu\text{g}$  Protein)
- (9)- Membranfraktion MS (20 $\mu\text{g}$  Protein)
- (10)- Membranfraktion MS (40 $\mu\text{g}$  Protein)

Anhand der Ponceau-Färbung und der Analyse von Vinculin lässt sich die Proteinmenge in isolierten Tubuli gegenüber einer definierten Menge an cytosolischen- und membrangebundenen Proteinen abschätzen. In isolierten Tubuli von verschiedenen Präparationen mit ca. 3 Mill.  $\mu\text{m}^2$  Fläche (Abb. 34C-D, Lane 1, 3) lassen sich ca. 2-3 $\mu\text{g}$  Protein abschätzen, verglichen mit der cytosolischen und Membranfraktion (10 $\mu\text{g}$  Proteinmenge) (Abb. 34C-D, Lane 5, 8). In der doppelten Menge isolierter Tubuli (ca. 6,5 Mill.  $\mu\text{m}^2$ , Abb. 34C-D, Lane 2, 4) ist reproduzierbar auch die doppelte Menge an Proteinen, verglichen mit einer definiert aufgetragenen Menge, enthalten.

Im Western Blot ließ sich die Bande des Proteins PDE2A bei der erwarteten Größe von 95-97kDa deutlich in Proteinfractionen des Cytosols- (Abb. 34F, Lane 5-7) und von Membranen (Abb. 34F, Lane 8-10, MS) nachweisen. Die Intensität der PDE2A-Bande steigt mit der Erhöhung der Proteinmenge. In isolierten Tubuli ist ein schwaches PDE2A-Signal in Lane 2 und 4 (ca. 6,5 Mill  $\mu\text{m}^2$ ) zu detektieren. Aufgrund der ähnlichen Bandenintensität zu cytosolischen- und Membranprotein-Fractionen mit einer Proteinmenge von 10 $\mu\text{g}$  (Abb. 34F, Lane 5 und 8) enthält die Probe mit Laser-mikrodissezierten Tubuli ca. 4-6 $\mu\text{g}$  Protein.

#### 4.1.14 sGC-Expression in Laser-mikrodissezierten Tubuli seminiferi des menschlichen Hoden

An das Rezeptorprotein lösliche Guanylylclase (sGC) kann das Signalmolekül Stickstoffmonoxid binden und dadurch die Synthese von cGMP stimulieren. Es stellte sich die Frage, ob dieses Protein in humanen Hodentubuli nach Mikrodissektion via Western Blot nachzuweisen war.



**Abb. 35: Nachweis der sGC β<sub>1</sub>-Untereinheit in isolierten Tubuli seminiferi des Menschen**

Folgendes Auftragsschema wurde eingehalten:

- (1)- 100 Tubuli Hoden (3,3 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (2)- 200Tubuli Patient (6,3 Mill.  $\mu\text{m}^2$ )
- (3)- Cytosolische Fraktion S1 (10 $\mu\text{g}$  Protein)
- (4)- Cytosolische Fraktion S1 (20 $\mu\text{g}$  Protein)
- (5)- Cytosolische Fraktion S1 (40 $\mu\text{g}$  Protein)
- (6)- Membranfraktion MS (10 $\mu\text{g}$  Protein)
- (7)- Membranfraktion MS (20 $\mu\text{g}$  Protein)
- (8)- Membranfraktion MS (40 $\mu\text{g}$  Protein)

In Laser-mikrodissezierten Tubuli seminiferi konnte bei der Analyse von 200 Tubuli (ca. 6,3 Mill.  $\mu\text{m}^2$ ) die sGC β<sub>1</sub>-Untereinheit detektiert werden. Die erwartete Größe des Proteins lag bei 68kDa. Die Intensität der sGC-Bande erhöhte sich mit ansteigender Proteinmenge in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion (Abb. 35)

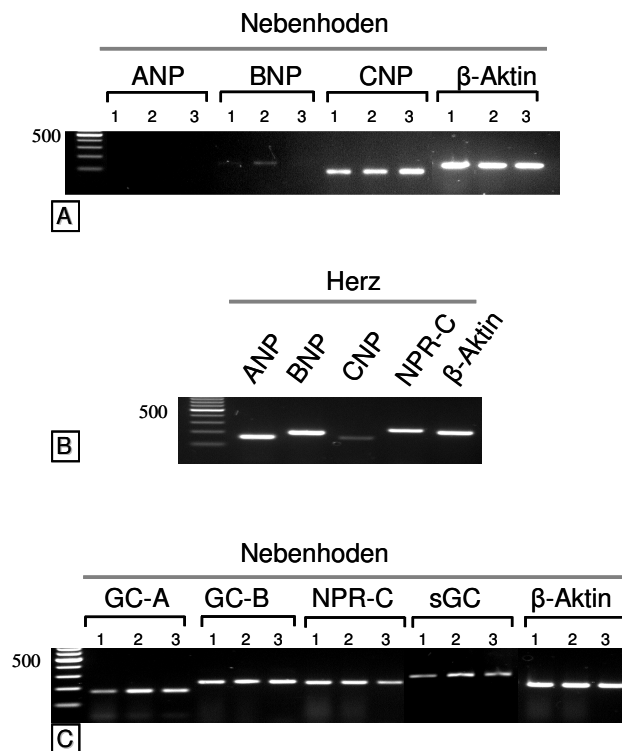


## 4.2. Untersuchungen im Nebenhoden

### 4.2.1 Nachweis spezifischer Komponenten des cGMP-Signalweges in der Ratte

Im Nebenhoden erfolgten ebenfalls RT-PCR-Untersuchungen spezifischer Gene, welche am Regulationsprozess des „second-messenger“-Moleküls cGMP beteiligt sind (Mewe *et al.*, 2006; (Turner *et al.*, 2007). Bisher liegen nur spärliche Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der Hormone ANP, BNP und CNP in den einzelnen Abschnitten (Caput, Corpus, Cauda) des Nebenhodens vor.

Es wurde auf Transkriptionsebene die Expression dieser Hormone und deren Rezeptoren im Ratten-Nebenhoden untersucht. Die Daten konnten in 5 verschiedenen Tieren reproduziert werden (Abb. 36).



**Abb. 36: Untersuchung einiger Transkripte des cGMP-Signalweges in definierten Regionen des Ratten-Nebenhodens**

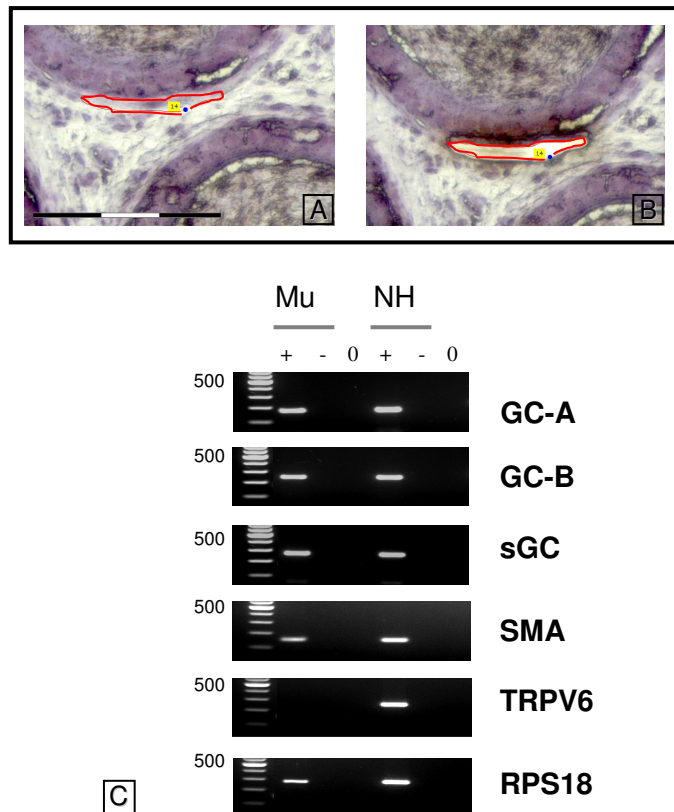
A-C: RT-PCR-Untersuchungen wurden an Gesamtpräparationen des Ratten-Nebenhodens durchgeführt. A: Die Expression der Transkripte für die Hormone ANP (152bp), BNP (195bp) und CNP (152bp) wurden in den Abschnitten Caput (1), Corpus (2) und Cauda (3) überprüft. B: Zur Kontrolle wurde die Expression im Rattenherzen überprüft. C: Die Expression der Rezeptoren GC-A (172bp), GC-B (234bp), dem Clearance-Rezeptor NPR-C (226bp) und des NO-Rezeptors sGC (261bp) wurden ebenfalls in Caput, Corpus und Cauda untersucht. Als interne Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (209bp) als „Housekeeping“-Gen eingesetzt. Die RT-PCR-Analysen wurden unabhängig voneinander an 5 verschiedenen Organ-Präparationen wiederholt. Als Längenstandard diente ein 100bp DNA-Marker.

ANP-Expression konnte nicht im Nebenhoden nachgewiesen werden. Allerdings war ein schwaches Signal von BNP im Caput- sowie in der Corpus-Präparation im Agarosegel sichtbar. Das lokal gebildete und parakrin wirkende natriuretische Peptid CNP konnte in allen drei Abschnitten des Nebenhodens nachgewiesen werden. Die Exaktheit der RT-PCR wurde durch das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin bestätigt. Um die Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen, wurde die Expression von ANP, BNP, CNP und dessen Rezeptor NPR-C in einer Präparation des Rattenherzens untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich für die Transkripte der Hormonvorstufen ANP und BNP, sowie des Clearance-Rezeptors NPR-C eine deutliche Bande im Agarosegel. Das Peptid CNP wies nur eine schwache Expression im Herzen auf.

Parallel zur Untersuchung der natriuretischen Peptide wurden auch deren Rezeptoren auf die Expression in Caput, Corpus, Cauda untersucht. Die mRNA der cGMP-bildenden Proteine GC-A, GC-B und NPR-C, sowie die im Cytoplasma vorkommende sGC, konnten in allen drei Abschnitten des Nebenhodens detektiert werden.

#### 4.2.2 Exakte Lokalisierung der Transkripte cGMP-bildenden Proteine GC-A, GC-B und sGC im Nebenhoden der Ratte

Analog zur Lokalisierung von Genen in bestimmten Kompartimenten im Hoden wurde die Methode der LCM in Kombination mit spezifischen Markergenen auch im Nebenhoden angewendet (Abb. 37).



**Abb. 37: Nachweis von Transkripten cGMP-bildender Rezeptoren in der Laser-mikrodissezierten Muskelschicht der Ratte**

A, B: Kryoschnitte des Nebenhodens, bei denen durch LCM ausgeschnittene Anteile der Muskelschicht markiert sind. Der Balken gibt eine Länge von 150 μm an.

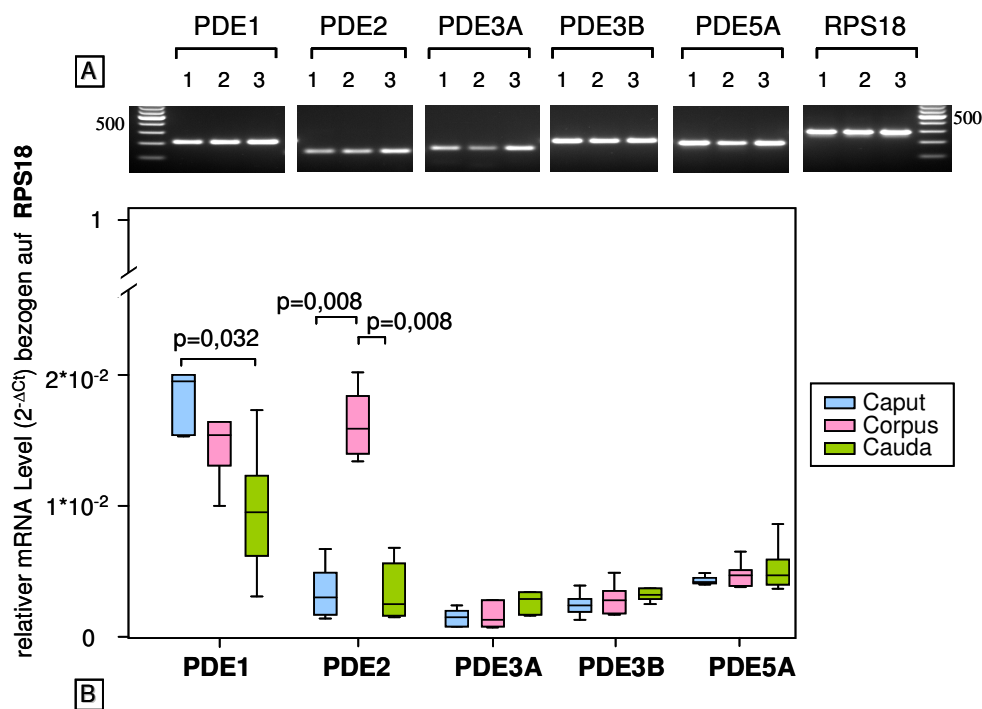
C: Nachweis der Guanylylzyklasen GC-A (172bp), GC-B (234bp) und sGC (261bp) durch RT-PCR in der isolierten Muskelschicht (Mu) des Nebenhodengangs. Eine Gesamt-Nebenhodenpräparation (NH) diente als Positivkontrolle. RPS18 (292bp) gehört zur kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) und wurde hier als Housekeeping-Gen verwendet. Ein SMA-spezifischer Primer (148bp) wurde als Marker für Muskelzellen eingesetzt. Als Marker für Epithelzellen diente TRPV6 (259bp). „+“, „-“ und „0“ repräsentieren die Kontrollen mit reverser Transkriptase, ohne reverse Transkriptase und die Wasserkontrolle für die PCR. Als Längenstandard dient ein 100bp DNA-Marker.

Die Expression der Gene für GC-A, GC-B und sGC konnte in der Muskelschicht in den Abschnitten Caput und Corpus des Nebenhodens lokalisiert werden. Eine Kontamination durch nicht-erwünschte Nachbarzellen der Muskelschicht während des Laser-Vorgangs konnte durch das Fehlen des Epithelmarkers TRPV6 (Weissgerber *et al.*, 2011) in der RT-PCR ausgeschlossen werden.

#### 4.2.3 Relative Expression verschiedener PDE-Isoformen in Caput, Corpus und Cauda

Uns standen für funktionelle Untersuchungen spezifische PDE-Inhibitoren zur Verfügung. Dazu gehörten der PDE1-Inhibitor Dioclein, der PDE2-Inhibitor BAY-60-7550, der PDE3-Inhibitor Trequinsin und der PDE5-Inhibitor Sildenafil. Deshalb stellten wir uns die Frage, ob

die Isoformen PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A in den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens der Ratte exprimiert werden. Gleichzeitig konnte mit quantitativer Real-Time-PCR das mRNA-Level der spezifischen PDE-Isoformen in Caput, Corpus und Cauda im Vergleich zum Housekeeping-Gen RPS18 validiert werden. Für die Versuche wurden Caput, Corpus und Cauda-Anteile von 5 verschiedenen Ratten gepoolt.



**Abb. 38: Box-Plot Darstellung der relativen Expression spezifischer PDE-Isoformen in definierten Abschnitten des Nebenhodens**

A: RT-PCR-Analysen von PDE1 (211bp), PDE2 (130bp), PD3A (149bp), PDE3B (206bp), PDE5A (193bp) und dem „Housekeeping“-Gen RPS18 (292bp) in Caput (1), Corpus (2) und Cauda (3) des Nebenhodens.

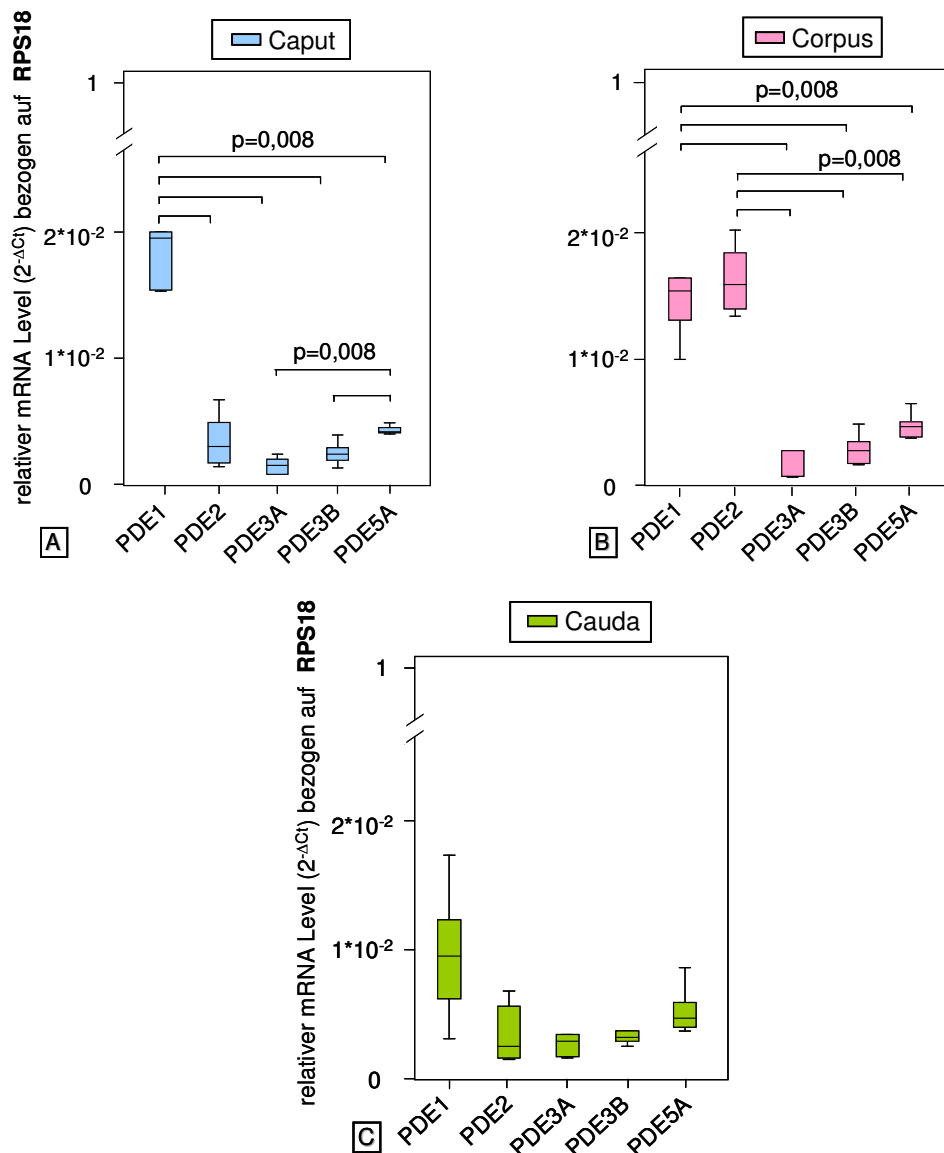
B: Die qPCR-Experimente erfolgten von denselben Proben wie zuvor die RT-PCR, um die relative Expression der PDE-Isoformen PDE1, 2, 3A, 3B und 5A in Abschnitten des Nebenhodens zu bestimmen. Es wurden unabhängige Versuche an 5 verschiedenen Tieren durchgeführt. Die statistischen Auswertungen ( $p < 0,05$  Mann-Whitney-Test) erfolgten zusammengefasst mit dem Programm GraphPad für alle 5 Tiere.

Die PDE-Isoformen PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A konnten mit RT-PCR-Analysen in allen drei Abschnitten des Nebenhodengangs nachgewiesen werden. Die relative Expression der PDE-Isoformen lag konstant unter dem RPS18-Expressionsniveau.

Die PDE1-Expression zeigte einen signifikanten Unterschied von Caput zu Cauda (Caput > Cauda,  $p < 0,032$  Mann-Whitney-Test). PDE1 weist in der Cauda eine hohe Streuung auf, während das für die anderen PDEs nicht zutrifft.

PDE2 ist signifikant höher exprimiert im Corpus verglichen mit den Abschnitten Caput und Cauda ( $p < 0,008$  Mann-Whitney-Test). Die Isoformen PDE3A, PDE3B und PDE5A zeigten innerhalb der Abschnitte keinen signifikanten Unterschied in ihrem mRNA-Level.

Man kann nicht nur das relative Verhältnis einer PDE-Isoform im Verlauf von Caput zu Cauda bewerten, sondern auch das Expressionsverhalten verschiedener PDEs zueinander innerhalb eines Nebenhodenabschnitts vergleichen (Abb. 39).



**Abb. 39: Box-Plot Darstellung des quantitativen Verhältnisses spezifischer PDE-Isoformen in einzelnen Nebenhodenabschnitten**

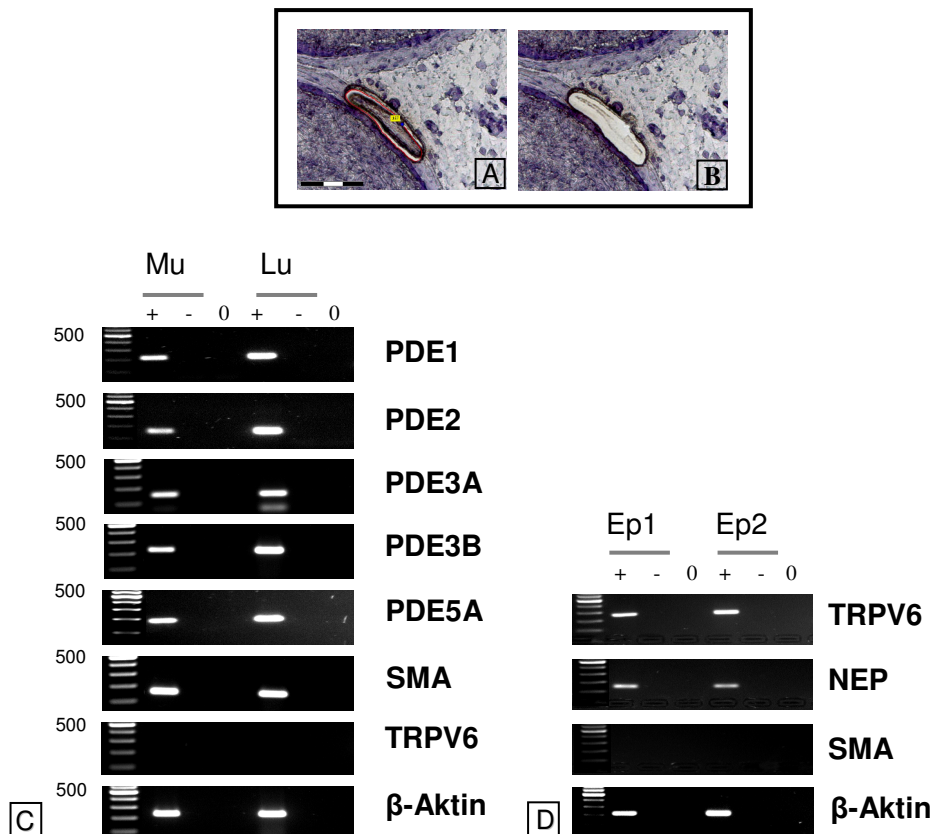
A-C: Die relative Expression der spezifischen PDE-Isoformen PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A zueinander wurden in den Abschnitten Caput (A), Corpus (B) und Cauda (C) des Nebenhodens untersucht. Die statistischen Auswertungen ( $p < 0,05$  Mann-Whitney-Test) erfolgten mit SPSS.

Im Caput war die Expression von PDE1 signifikant höher als die der PDE-Isoformen PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A. Im Vergleich zu PDE3A und PDE3B ist PDE5A signifikant höher exprimiert ( $p < 0,008$  Mann-Whitney-Test). Ein signifikanter Unterschied von PDE1 und PDE2 im Vergleich zu PDE3A, PDE3B und PDE5A ließ sich im Corpus-Bereich belegen ( $p < 0,008$  Mann-Whitney-Test). In der Cauda-Region ließ sich jedoch kein Expressionsunterschied der PDE-Isoformen feststellen.

#### 4.2.4 Lokalisierung spezifischer PDE-Isoformen in der Muskelschicht des Cauda-Abschnittes

Bisher konnte das Vorkommen der PDE-Isoformen PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A in allen drei Abschnitten des Nebenhodens qualitativ durch RT-PCR bestätigt werden. Durch Real-Time-PCR war es möglich auch eine quantitative Aussage über das Expressionslevel dieser PDE-Isoformen untereinander bzw. in den einzelnen Regionen des Nebenhodens zu treffen.

Um im nächsten Schritt die Wirkung spezifischer PDE-Hemmer auf die Kontraktilität der Muskelschicht untersuchen zu können, musste zunächst geklärt werden, ob die spezifischen PDEs tatsächlich in glatten Muskelzellen exprimiert werden. Für funktionelle Untersuchungen im Organbad wurde ein Teil des Nebenhodengangs aus der Cauda-Region verwendet, somit fokussierten sich unsere RT-PCR-Untersuchungen auf die isolierte Muskelschicht dieses Nebenhodenabschnitts.



**Abb. 40: Nachweis spezifischer PDEs in der Laser-mikrodissezierten Muskelschicht des Caudaabschnittes des Rattennebenhodens**

A, B: Kryoschnitte des Nebenhodens, bei denen durch LCM ausgeschnittene Anteile der Muskelschicht der Cauda markiert sind. Der Balken gibt eine Länge von 150μm an.

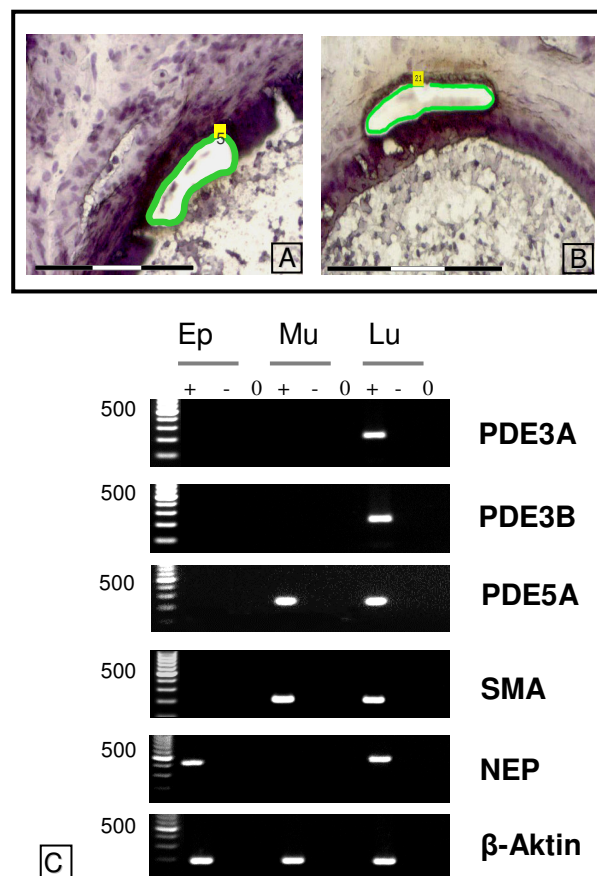
C-D: Folgende Primer wurden in der RT-PCR eingesetzt: PDE1 (211bp), PDE2 (130bp), PDE3A (149bp), PDE3B (206bp), PDE5A(193bp), SMA (148bp), TRPV6 (259bp), NEP (156bp) und β-Aktin (209bp). Für die TRPV6-Primersequenzen wurden zwei unabhängige Epithel-Proben (Ep1-2) als Positivkontrollen überprüft (D). In diesem Telexperiment diente SMA als Muskelzellmarker. Als weiterer Epithelmarker neben TRPV6 wurde NEP ausgewählt. Mu bezeichnet die mikrodissezierte Muskelschicht, während eine Lungenpräparation (Lu) und das Housekeeping-Gen β-Aktin als Kontrollen dienten. „+“, „-“ und „0“ repräsentieren die Kontrollen mit reverser Transkriptase, ohne reverse Transkriptase und die Wasserkontrolle für die PCR. Als Längenstandard dient ein 100bp DNA-Marker.

Mit Hilfe der LCM konnten Muskellzell-Areale aus dem Caudabereich isoliert und anschließend in der RT-PCR mit zusätzlichen Markern genau definiert werden. Die Gentranskripte der untersuchten PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A konnten eindeutig in der Muskelschicht mit Hilfe des Muskelzellmarkers SMA nachgewiesen werden. Ein Fehlen des Epithelmarkers TRPV6 bestätigte, dass keine Kontamination der Muskelproben vorlag. TRPV6 ist ein Transmembran-spannender Kanal für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, der bisher im Epithel von Nebenhoden, Plazenta und Prostata nachgewiesen wurde (Fecher-Trost *et al.* 2013.). Lungenpräparationen bei denen die TRPV6-Primer kein positives Signal zeigten, dienten als Negativkontrolle. Um die Spezifität der Primer zu verifizieren, wurde die

Expression von TRPV6 und einem zusätzlichen Epithelmarker NEP in zwei unabhängigen Epithelproben des Nebenhodengangs nachgewiesen (Abb. 40D). Die Reinheit der Epithelproben konnte durch die Abwesenheit des Muskelzellmarkers SMA bestätigt werden.

#### 4.2.5 Lokalisierung spezifischer PDE-Isoformen in glatten Muskelzellen des humanen Nebenhodengangs

Zusätzlich zu Expressionsuntersuchungen von PDEs im Nebenhodengang der Ratte wurde das Vorkommen von PDE-Isoformen auch im menschlichen Nebenhoden überprüft. Allerdings konnten nur Präparationen von drei verschiedenen Caput- und Corpus-Biopsien verwendet werden. Menschliche Proben aus der Cauda-Region standen uns nicht zur Verfügung.



**Abb. 41: Lokalisierung spezifischer PDEs im humanen Nebenhoden**

A, B: Kryoschnitte des Nebenhodens, bei denen durch LCM ausgeschnittene Anteile der Epithel- und Muskelzellschicht markiert sind.

C: RT-PCR-Analysen von PDE3A (236bp), PDE3B (242bp) und PDE5A (245bp) mit isolierten Epithel- (Ep) und Muskelzellen (Mu) des humanen Nebenhodens. SMA (140bp) wurde als Marker für Muskelzellen und NEP (411bp) als Marker für Epithelzellen eingesetzt. Eine Lungenpräparation (Lu) und das Gen β-Aktin (199bp) dienten als interne

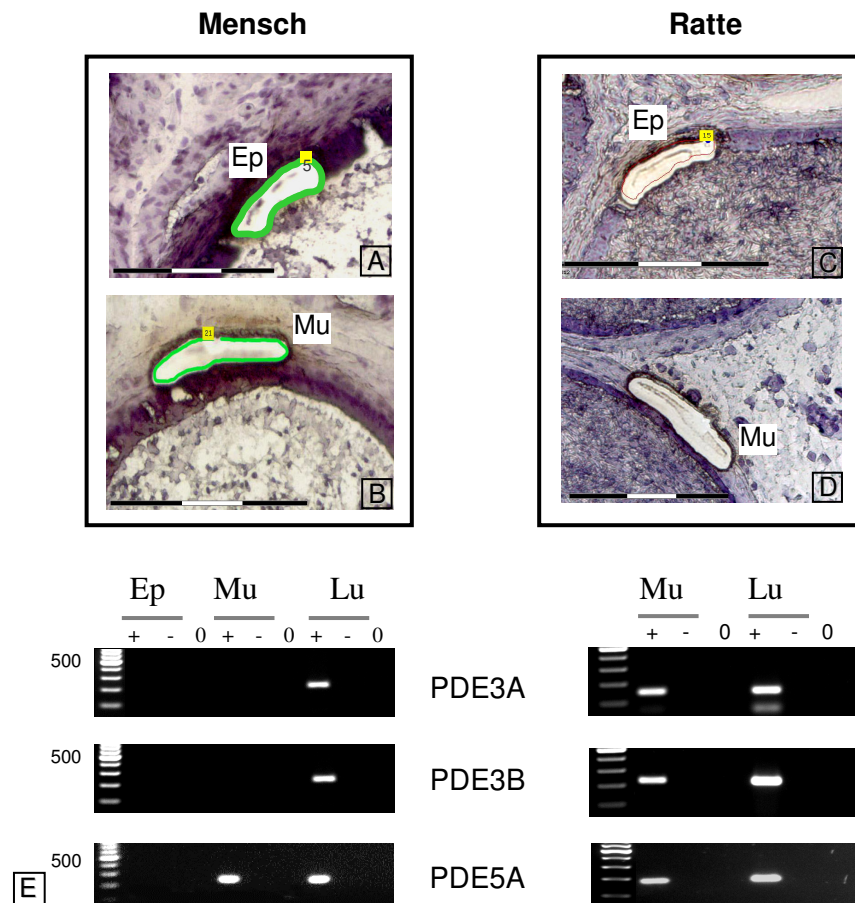


Positivkontrollen. „+“, „-“ und „0“ repräsentieren die Kontrollen mit reverser Transkriptase, ohne reverse Transkriptase und die Wasserkontrolle für die PCR.

Transkripte der Isoformen PDE3A und PDE3B konnten weder in isolierten Epithel- noch in Muskelzellen nachgewiesen werden. Ein Signal der PDE5A war nur in der Muskelschicht detektierbar (Abb. 41C). Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl die PDE-Isoformen PDE3A und B als auch PDE5A in der humanen Lunge exprimiert werden, sodass eine Lungenpräparation als Positivkontrolle diene (Fan Chung, 2006; Hemnes *et al.*, 2006; Luong *et al.*, 2011). Durch den Gebrauch zusätzlicher Epithel- und Muskelzellmarker konnten Kontaminationen von nicht gewünschten Nachbarzellen in den gepickten Proben ausgeschlossen werden. SMA konnte nur in der Muskelschicht-Probe und der Epithelmarker NEP dementsprechend nur in der Epithelprobe nachgewiesen werden.

#### 4.2.6 Vergleich der Lokalisation spezifischer PDE-Isoformen im Nebenhoden von Mensch und Ratte

Im Vergleich zeigten die Mensch- und Rattendaten Unterschiede im Expressionsverhalten der untersuchten Isoformen PDE3A, PDE3B und PDE5A (Abb. 42E).



**Abb. 42: Vergleich der Expression und Lokalisierung spezifischer PDEs im Nebenhoden von Mensch und Ratte**

A, B: Kryoschnitte des Nebenhodengangs des Menschen, bei denen durch LCM ausgeschnittene Anteile der Epithel- und Muskelzellschicht markiert sind.

C, D: Kryoschnitte des Nebenhodens der Ratte, bei denen durch LCM ausgeschnittene Anteile der Epithel- und Muskelzellschicht markiert sind. Der Balken gibt eine Länge von 150µm an.

E: RT-PCR von Mensch und Ratte im Vergleich. Mikrodissezierte Epithelschicht wird durch Ep und Muskelschicht durch Mu gekennzeichnet. Lunge (Lu) diente als Kontrolle. „+“, „-“ und „0“ repräsentieren die Kontrollen mit reverser Transkriptase, ohne reverse Transkriptase und die Wasserkontrolle für die PCR. Als Längenstandard dient ein 100bp DNA-Marker.

PDE3A und PDE3B konnten in Laser mikrodissezierten glatten Muskelzellen des Rattennebenhodens lokalisiert werden, fehlten jedoch gänzlich in mikrodissezierten Proben des menschlichen Nebenhodens. PDE5A wurde in der Muskelschicht von Mensch- und Rattenproben nachgewiesen. PDE5A-Expression war hingegen nicht in der Epithelschicht

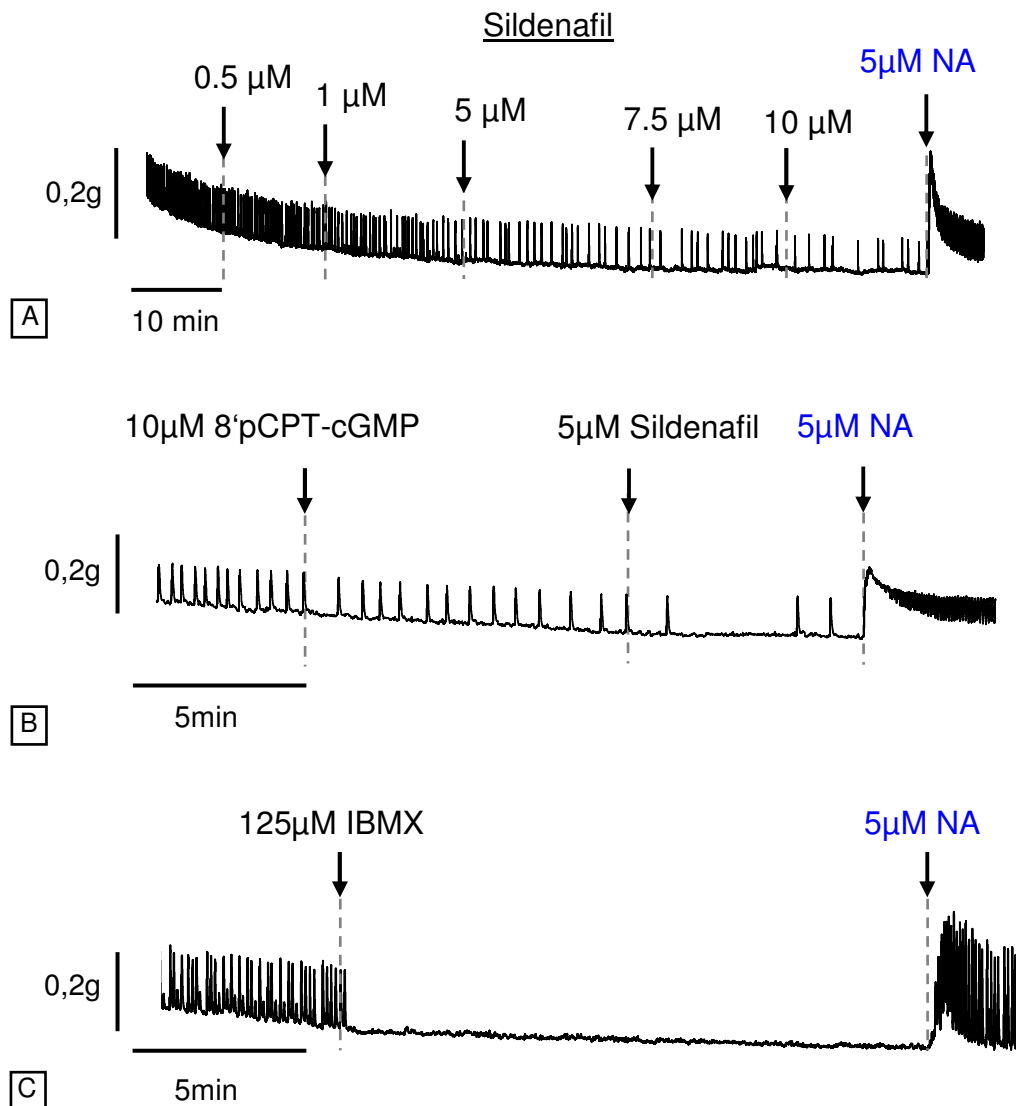
von menschlichen Nebenhoden-Präparationen nachzuweisen. Kontaminationen konnten wiederum durch die Verwendung zusätzlicher Marker, SMA als Muskelzellmarker und NEP sowie TRPV6 als Epithelmarker (Abb 40C-D und 41C), ausgeschlossen werden.

Da die Rattenuntersuchungen Basis für Organbadstudien sein sollten, wobei Kontraktion bzw. Relaxation der Muskelzellschicht untersucht wurden, wurde auf den Nachweis von PDE3A und B bzw. PDE5A in mikrodisssezierter Epithelzellschicht der Ratte verzichtet.

#### 4.2.7 Kontraktionsstudien am Nebenhodengang der Ratte

Um die funktionelle Bedeutung spezifischer PDE-Isoformen auf die Kontraktilität von Muskelzellen zu untersuchen, wurden die Effekte spezifischer PDE-Inhibitoren an Nebenhodengang-Abschnitten im Organbad analysiert. Durch unsere RT-PCR-Studien konnten folgende Transkripte cGMP-degradierender Enzyme in der isolierten Muskelschicht des Nebenhodenganges der Ratte nachgewiesen werden: PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5A. Für diese PDE-Isoformen standen uns spezifische PDE-Inhibitoren zur Verfügung. Um die Sensitivität von relaxierenden Agonisten auf das Kontraktionsmuster des Nebenhodenganges zu ermitteln, wurden Konzentrationsreihen von verschiedenen spezifischen PDE-Inhibitoren erstellt. Die Hemmung der Signalmoleküle cGMP bzw. cAMP führt auf verschiedenen Wegen zu einer Senkung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und somit zu einer Relaxation glatter Muskelzellen. Mittels isometrischer Kontraktionsmessungen konnten Effekte spezifischer PDE-Hemmer am Nebenhodengang der Ratte beobachtet werden. Die genaue Beschreibung der Durchführung des Organbads ist dem Methodenteil zu entnehmen.

In Abbildung 43A ist die Wirkung des spezifischen PDE5-Inhibitors Sildenafil in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe dargestellt.



**Abb. 43: Relaxierende Effekte verschiedener Stimuli im Organbad**

A: Nach jeweils 10min wurde das Cauda-Segment mit ansteigenden Sildenafil-Konzentrationen (0,5µM, 1µM, 5µM, 7,5µM und 10µM Endkonzentration im Bad) inkubiert. B: Verlangsamung der Frequenz durch cGMP-Analoga-Zugabe (10µM Endkonzentration) und Verstärkung dieses Effektes durch Zugabe von Sildenafil (5µM Endkonzentration) nach weiteren 10min.

C: Inkubation mit dem unspezifischem PDE-Inhibitor IBMX (125µM Endkonzentration) löste eine starke Suppression der Spontankontraktion aus.

Die Zugabe von Noradrenalin (NA) in allen Ansätzen (A-C) löste erneut kontraktile Aktivität aus. Die Zeitpunkte der Zugabe von Substanzen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nach Vordehnung der Gangsegmente konnten regelmäßige und rhythmische Spontankontraktionen im Organbad detektiert werden. Eine zunehmende Abnahme des

Muskeltonus konnte durch die Inkubation mit ansteigenden Sildenafil-Konzentrationen gezeigt werden.

Die Spontanaktivität konnte außerdem durch externe cGMP-Analoga-Zugabe (8'pCPT-cGMP) reduziert werden. Dies resultierte in einer Verlangsamung der Frequenz. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Inkubation mit Sildenafil verstärkt, da das endogen vorhandene und das extern zugefügte cGMP-Analoga nicht mehr durch PDE5 abgebaut werden konnte (Abb. 43B).

Die Zugabe des nicht-selektiven Inhibitors IBMX resultierte in einer Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels, sodass es anschließend zu einer Abnahme der Spontanaktivität kam. Dieser Effekt deutet darauf hin, dass nicht nur PDE5 eine Rolle im Relaxationsprozess spielt, sondern auch andere PDEs daran beteiligt sind.

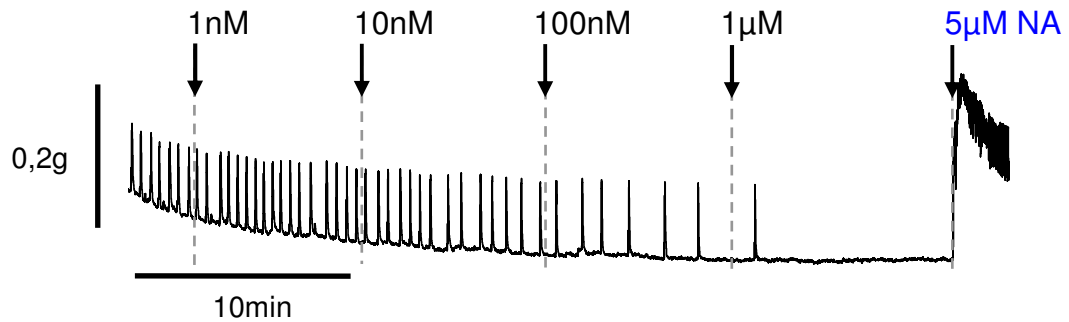
In allen Abbildungen 43A-C konnte gezeigt werden, dass das Gewebe nach PDE-Inhibition wieder durch Noradrenalin stimuliert werden kann, sichtbar als starke Erhöhung der Frequenz. Die NA-Zugabe zeigte die Vitalität der Gewebeselemente am Ende des Versuches und diente in allen Organbad-Experimenten als Kontrolle.

#### 4.2.7.1 PDE2-Inhibition durch BAY60-7550

PDE2 konnte in der Muskelzellschicht des Caudabereichs des Ratten-Nebenhodengangs lokalisiert werden (Abb. 40C).

PDE2 ist eine cGMP-stimulierte PDE, die vorzugsweise cAMP hydrolysiert (Russwurm *et al.*, 2009) und übernimmt eine wichtige Rolle im „cross-talk“ zwischen den cAMP- und cGMP-Signalwegen. Inwiefern PDE2 einen Einfluss auf den cAMP/cGMP-Spiegel in der Muskelschicht des Nebenhodens hat und somit eine Veränderung des Muskeltonus auslöst, sollte durch den PDE2-selektiven Inhibitor BAY60-7550 geklärt werden (Abb. 38).

#### BAY60-7550



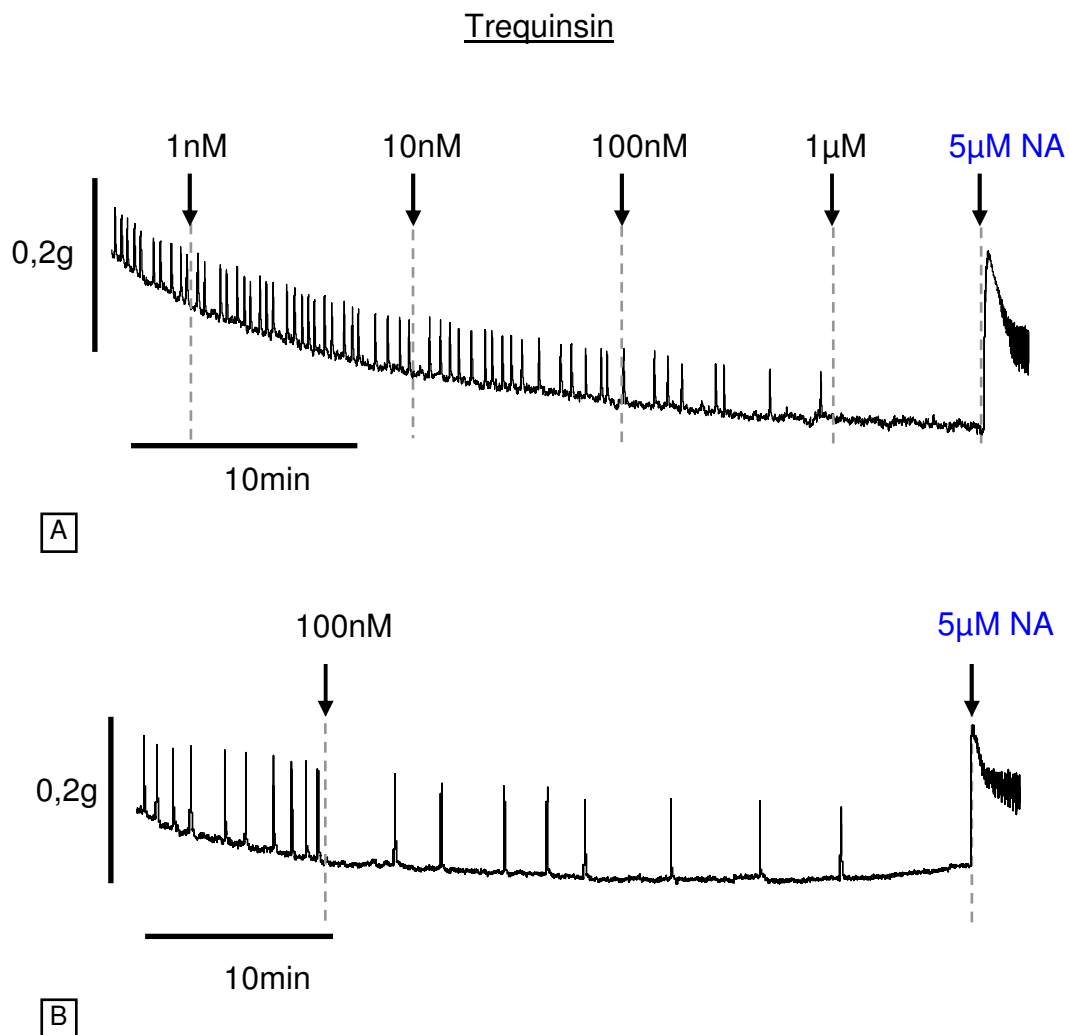
**Abb. 44: Inhibitorische Wirkung ansteigender Konzentrationen des selektiven PDE2-Inhibitors BAY60-7550**

Relaxierende Effekte von Bay60-7550 in einer ansteigenden Konzentrationsreihe (1nM, 10nM, 100nM und 1µM Endkonzentration) auf verschiedene Gangsegmente. Die Versuche wurden 5-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Nach der Inkubation mit zunehmenden Bay60-7550-Konzentrationen im Abstand von ca. 8min zeigte das Frequenzmuster eine erkennbare kontinuierliche Verlangsamung. Diese wurde ab dem 2. Zeitpunkt (Pfeil), bei dem 10nM als Endkonzentration in der Badlösung vorhanden war, deutlich.

#### 4.2.7.2 PDE3-Inhibition durch Trequinsin

Im Gegensatz zu PDE2 wird die Hydrolyseaktivität der PDE3 durch cGMP inhibiert. Neben PDE2 konnten auch die Isoformen von PDE3A und B in der isolierten Muskelschicht des Ratten-Nebenhodengangs lokalisiert werden (Abb. 40C). Trequinsin (Friis *et al.*, 2002) wurde als spezifischer PDE3-Inhibitor beschrieben.



**Abb. 45: Inhibitorische Wirkung ansteigender Konzentrationen des selektiven PDE3-Inhibitors Trequinsin**

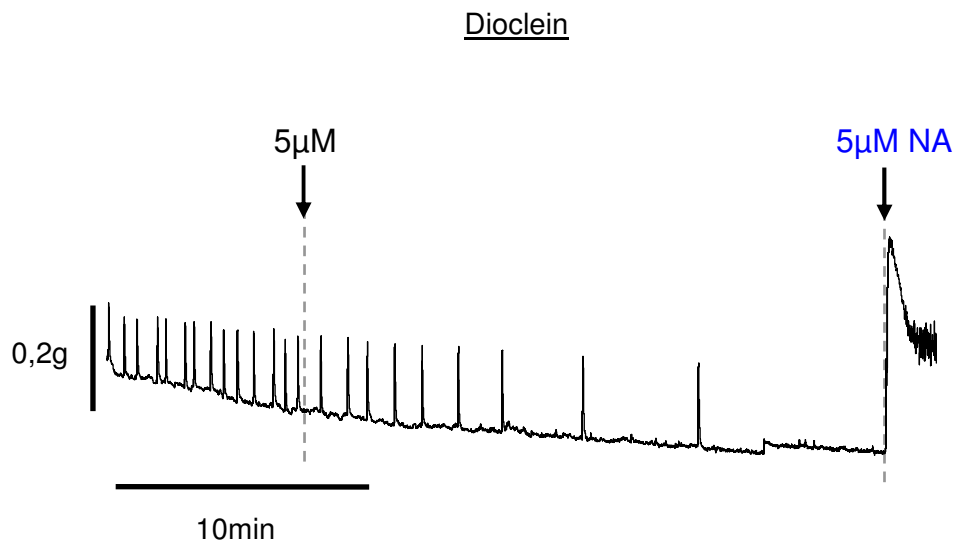
A-B: Relaxierende Effekte von Trequinsin in einer ansteigenden Konzentrationsreihe (1nM, 10nM, 100nM und 1µM Endkonzentration, A) und mit einer einzelnen Zugabe von 100nM (B) auf verschiedene Gangsegmente. Die Versuche wurden 4-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Laut Literaturangaben (Lugnier *et al.*, 1986) liegt der  $IC_{50}$ -Wert bei ca. 1µM. Im Organbad wurden niedrigere Konzentrationen (Abb. 45A) in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (1nM, 10nM, 100nM und 1µM) eingesetzt. Im Abstand von ca. 8min wurden zunehmende Trequinsin-Konzentrationen zur Nährstofflösung gegeben. Eine deutliche Verlangsamung der

Spontanaktivität konnte bei 100nM gezeigt werden. Dieser Effekt wurde durch einen weiteren Versuch mit einer Einzel-Zugabe von 100nM (Abb. 45B) bestätigt.

#### 4.2.7.3 PDE1-Inhibition durch Dioclein

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige PDE1 ist eines der Schlüsselenzyme im „cross-talk“ zwischen zyklischen Nukleotiden und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwirkung in der Zelle.



**Abb. 46: Einfluss des PDE1-Inhibitors Dioclein auf die Spontanaktivität von Nebenhodengang-Segmenten der Ratte**

Relaxierender Effekt von 5µM Dioclein auf Spontankontraktionen der Muskelzellen aus der Cauda. Da nur sehr wenig dieser Substanz vorhanden war, wurde auf eine Konzentrationsreihe verzichtet. Der Versuch wurde ca. 4-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Selektivität der in der Literatur beschriebenen PDE1-Inhibitoren Vinpocetin und 8MM-IBMX ist limitiert (Jeon *et al.*, 2005; Lugnier, 2006), sodass die funktionelle Rolle der PDE1-Isoenzyme in weiten Teilen weiterhin spekulativ verbleibt.

Auch der nicht-kommerziell erhältliche PDE1-Inhibitor Dioclein wird eine hemmende Wirkung auf die PDE1 zugeschrieben (Goncalves *et al.*, 2009; Lugnier, 2011). Die Spontanaktivität wurde nach Zugabe von 5µM deutlich herabgesetzt (Abb. 46). Da uns Dioclein nur in geringer Menge zur Verfügung stand, konnten keine konzentrationsabhängigen Experimente durchgeführt werden, sodass unklar bleibt, ob es sich hierbei um einen Effekt durch PDE1-Inhibition handelt.



## 5 Diskussion

### 5.1.1 Vor- und Nachteile der Laser Capture Mikrodisektion

Bisher konnte eine Vielzahl der Komponenten des cGMP-Signalweges, die eine Relevanz für die Relaxation der Muskelschicht der Tubuli seminiferi haben, im männlichen Reproduktionstrakt nachgewiesen werden (Middendorff *et al.*, 1996; Middendorff *et al.* 1997b; Middendorff *et al.*, 2000a; Middendorff *et al.*, 2000b; Mewe *et al.*, 2006a; Müller *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2011; Mietens *et al.*, 2012; Mietens *et al.*, 2014; Thong *et al.*, 2014). Allerdings fehlten detaillierte Kenntnisse über Expression, Lokalisierung und Verteilung fast aller zyklischen Nukleotid-degradierenden Phosphodiesterasen im Hoden und NH des Menschen.

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Lokalisation von Genen das Verfahren der Laser-Capture-Mikrodisektion mit einer molekularbiologischen Methode (RT-PCR) kombiniert. Mit Primern für zelltypspezifische Moleküle war es möglich eine Aussage über die Lokalisation von PDE-mRNA in unverdickter und pathologisch verdickter LP im Vergleich zu benachbarten Strukturen zu treffen.

Die Kontaminationsgefahr während des Laservorgangs ist zwar gering, da keine manuelle Manipulation vonstatten geht (Espina *et al.*, 2006), aber nicht ausgeschlossen. Das Hodengewebe besteht aus kompakten und weniger kompakten Bereichen, sodass die Stärke und Schneidegenauigkeit des Lasers dadurch beeinflusst werden kann. Aufgrund des heterogen aufgebauten Hodengewebes und der teilweise schlecht einzuschätzenden Abgrenzung von benachbarten Gewebeanteilen (LP vs Keimepithel) kann es durch die hoch-sensitive RT-PCR-Methode zu „falsch-positive“ Resultaten kommen. Die Markierung des gewünschten Bereichs, der nachfolgend durch den Laser mikrodiseziert werden soll, steht unter visueller Kontrolle und ist daher subjektiv ausgewählt. Zusätzlich kann die Dicke des Hodenquerschnittes ebenfalls einen Einfluss auf die PCR-Resultate haben. Die Zellen liegen im Hodenquerschnitt in verschiedenen Ebenen, sodass unerwünschte Zellen mitgelasert werden können und die Probe verunreinigen können. Um Kontaminationen der mikrodisezierten Proben auszuschließen, haben wir zellspezifische Markergene zur Qualitätskontrolle

ausgewählt. Dieses neu entwickelte System stellt also eine Erweiterung der LCM-Methode mit nachfolgender RT-PCR, zur eindeutigen Bestimmung von Zellbereichen dar. Um Keimzellen und Sertoli-Zellen klar von der LP-Schicht unterscheiden zu können, haben wir als Keimzellmarker CatSperI (Ren *et al.*, 2001; Nikpoor *et al.*, 2004; Hildebrand *et al.*, 2010) und als Sertoli-Zellmarker AMH ausgewählt (Tüttelmann *et al.*, 2009). CatSperI bezeichnet einen Spermien-spezifischen Kationen-Kanal, welcher die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Spermien reguliert und dadurch die Spermienmotilität steuert (Ren *et al.*, 2001; Brenker *et al.*, 2012). Das Protein wird auch in Meiose-Stadien während der Spermatogenese exprimiert (Quill *et al.*, 2001). Die Abwesenheit von CatSperI-Transkripten impliziert eine Störung in der Keimzellreifung, so dass ein Fehlen dieses Markers in der RT-PCR die Abwesenheit von reifen Keimzellen anzeigt. Der verwendete Marker AMH wird von Sertoli-Zellen sezerniert und spielt eine Rolle während der Embryonalentwicklung. Darüber hinaus ist das AMH-Level auch im erwachsenen Hoden nachweisbar.

Durch den Marker SMA wurden eindeutig Muskelzellpopulationen der LP des Hodens sowie der Muskelschicht des NH bestimmt (Holstein *et al.*, 1996). Weitere Bereiche im NH, z.B. die Epithelschicht, wurden durch Gene, die exklusiv nur in Epithelzellen exprimiert werden, definiert. Wir haben dafür die Marker TRPV6 und NEP gewählt. TRPV6 ist ein membranspannender  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, welcher epithelial im NH, Prostata und Plazenta u.a. exprimiert wird (Weissgerber *et al.*, 2011; Weissgerber *et al.*, 2012; Fecher-Trost *et al.*, 2013). Dieser Kanal ist konstitutiv aktiv und für den passiven Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten über die Membran verantwortlich. NEP ist ein Membranrezeptor mit Metallopeptidase-Aktivität, welcher apikal im NH-Epithel lokalisiert ist (Thong *et al.*, 2014). NEP ist in der Lage eine Vielzahl biologisch aktiver Peptide wie Enkephaline, Bradykinin, Endothelin-1, Neurotensin und natriuretische Peptide zu spalten und zu inaktivieren (Corti *et al.*, 2001). NEP reguliert dadurch indirekt die lokale Konzentration dieser Peptide an der Zelloberfläche und beeinflusst die Rezeptorvermittelte zelluläre Aktivität (Turner *et al.*, 2001).

Die in dieser Dissertationsschrift zugrunde liegende Arbeit entwickelte erweiterte Methode der LCM mit integrierter Spezifitätskontrolle wurde zusätzlich zu den hier

dargestellten Themenkomplexen bereits in anderen Projekten der Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet (Volkman *et al.*, 2011; Mietens *et al.*, 2012; Mietens *et al.*, 2014; Thong *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte die LCM-Methode ebenfalls zum Nachweis von Proteinen via Western-Blot genutzt werden. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist wiederum die Auswahl definierter Zellbereiche zur Lokalisierung von spezifischen Proteinen, was bei der Proteinanalyse aus Gesamtgewebe mit Western Blot nicht möglich wäre. Allerdings müssen für die Analyse von Laser-mikrodissezierten Proteinen größere Probenmengen verwendet werden als für Untersuchungen auf molekularer Ebene. Das Auslasern von Gewebearealen mit einheitlichen Flächen ( $\mu\text{m}^2$ ) diente zur Orientierung der späteren Mengenbestimmung der Proteine im Western Blot. Die exakte Bestimmung von mikrodissezierten Proteinmengen erfolgte durch den Vergleich von Kontrollgeweben (cytosolische und Membran-Proteine in  $\mu\text{g}$ ). Zunächst wählten wir bekannte Proteine des cGMP-Weges aus, deren Expression im Hoden bekannt war. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits Untersuchungen über die Expression der Proteine GC-A (Müller *et al.*, 2004), sGC (Davidoff *et al.*, 1997; Middendorff *et al.*, 2000b) und PDE2A (Unveröffentlichte Daten: Andrea Mietens-Dissertationsschrift 2005.; Stephenson *et al.*, 2009) im Hoden durchgeführt, sodass man an dem zugrunde liegenden Wissen diesen Methodenansatz entwickeln konnte. Systematisch wurde zunächst die unbekannte Proteinmenge eines ganzen Hodenquerschnitts durch Vergleich mit definierten Proteinmengen (cytosolische und Membranproteine) anhand von Ponceau-Färbung der Membran abgeschätzt. Die Proteinmenge mikrodissezierter Proben konnte nun damit abgeschätzt werden.

Für die Zukunft wäre es möglich, die mikrodissezierten Proben zuvor auf Transkriptebene mit zellspezifischen Markern zu überprüfen, um die Reinheit der Proben zu gewährleisten. Anschließend könnte man mit der zuvor beschriebenen Methode, LCM mit anschließendem Western Blot, eindeutig Proteine in bestimmten Bereichen innerhalb eines Gewebes nachweisen. Voraussetzung für einen gesicherten Ablauf dieser Methode ist eine hohe Bindungsspezifität und Sensitivität des nachzuweisenden Antikörpers.

In dieser Doktorarbeit wurde die LCM in Verbindung mit RT-PCR und Western Blot beschrieben. Parallel dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe S. Galuska (Biochemie, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Giessen) spezifische Glykosylierung mit Massenspektrometrie in Laser-mikrodissezierten Epithelzellen des NH sogar von Paraffineingebettetem Gewebe nachgewiesen (Bartel *et al.*, 2014).

#### 5.1.2 PDE1C-Expression in peritubulären Zellen der LP

In der hier vorliegenden Arbeit konnte PDE1C-Expression in situ in unverdickter LP, aber nicht in verdickter LP mit RT-PCR nach LCM lokalisiert werden. Es stellt sich die Frage, ob das Fehlen der PDE1C in verdickter LP eine Rolle bei der Stimulierung oder Induktion fibrotischer Umbauprozesse spielt.

PDE1C ist in der Lage mit nahezu gleicher Affinität cAMP wie auch cGMP zu hydrolysieren. Es ist nicht bekannt, ob PDE1C in den peritubulären Zellen primär den cAMP oder den cGMP-Spiegel beeinflusst. Meine Ergebnisse zeigen, dass PDE1C nicht in verdickter LP im Zellverband exprimiert ist. Dadurch könnte der cAMP-Spiegel in den Zellen der verdickten LP erhöht sein und verschiedene Zellantworten auslösen. Neben dem Einfluss auf die Kontraktion von Muskelzellen und die Regulation von Ionenkanälen, kann cAMP auch mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren (z.B. CREB), die z.B. zu einer erhöhten Ablagerung extrazellulärer Matrix, z.B. KollagenI in der LP führen könnten. Über die möglichen Mechanismen ist allerdings noch nichts bekannt.

Die cAMP-Produktion in der Zelle wird durch die Bildung von Hormon-Rezeptor-Komplexen gesteuert. Allerdings ist noch weitestgehend unbekannt welche den cAMP-Spiegel beeinflussende Rezeptoren in der LP des Hodens exprimiert werden. Die Expression von Histamin-Rezeptoren H1 und H2 konnte in peritubuläre Zellen gezeigt werden (Albrecht *et al.*, 2005a). Diese Rezeptoren können das Mastzell-Produkt Histamin binden und über die Aktivierung verschiedener G-Proteine zu einer Erhöhung des cAMP-Levels innerhalb der peritubulären Zellen führen. Es ist bekannt, dass bei fibrotisch verdickter LP auch die Zahl von Makrophagen und Mastzellen erhöht ist (Albrecht, 2009). Vermehrte Mastzell-Produkte (Histamin s.o., TNF- $\alpha$ , Prostaglandin-Metabolite u.a.) könnten das sekretorische Verhalten von peritubulären Zellen

beeinflussen und so zu fibrotischen Veränderungen der LP beisteuern (Albrecht *et al.*, 2005b; Frungieri *et al.*, 2002; Schell *et al.*, 2008).

cAMP-Bildung und Wirkung können sogar in verschiedenen Zellen stattfinden. In Granulosazellen des Ovarialfollikels bewirkt die cGMP-Bildung über den GC-B-Rezeptor einen inhibitorischen Effekt auf PDE3A in der Oocyte. Über Gap-junctions kann das zyklische Nukleotid von den Granulosazellen in die Oocyte diffundieren und dort durch die Hemmung der PDE3A den cAMP-Spiegel erhöhen. Die PKA hemmt eine Zellzyklus-spezifische Kinase. Dadurch kommt es zum Meiosearrest der Oocyte (Conti *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2012). Dies führt zur Vermutung, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel in der verdickten LP in vivo auch auf Nachbarzellen wirken könnte und dort verschiedene Signalkaskaden auslösen könnte. Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Neben einem Einfluss auf den cAMP-Spiegel, kann PDE1C auch den cGMP-Spiegel beeinflussen. In peritubulären Muskelzellen des Hodens hat das cGMP-Signalsystem unter anderem Effekte auf die Muskelkontraktion (Middendorff *et al.*, 2000a). Inwieweit das Fehlen von PDE1C in verdickter LP in vivo einen Einfluss auf die Kontraktion von glatten Muskelzellen hat, ist nicht bekannt.

In Gefäßen können Effekte des cGMP-Signalweges, wie die Aktivierung von PKGI, unter anderem zur Proliferation und Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) führen. Dies ist essenziell für die vaskuläre Permeabilität und Angiogenese. In Herzmuskelzellen hat die Aktivierung des cGMP-Targetprotein PKGI einen Einfluss auf Kontraktilität und Hypertrophie der Zellen, sodass dies zur Apoptose führen kann (Sellak *et al.*, 2013). Bei einer Angiotensin II-induzierten Hypertrophie des Herzens wurde eine erhöhte Expression von PDE1- und PDE5-Aktivität festgestellt (Mokni *et al.*, 2010). In der Niere der Ratte wurde eine erhöhte PDE1-Aktivität nach einer Gallengang-Ligation festgestellt (Tahseldar-Roumieh *et al.*, 2009). In einem MRL/lpr lupus-prone-Mausmodell, welches der Erforschung der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses dient, wurden die Effekte des cGMP-Systems in verschiedenen Organen untersucht. Hypermetabolismus und Hypertrophie von Zellen resultiert bei dieser Krankheit in einer Fehlfunktion verschiedener Organe. Eine erhöhte PDE1-Aktivität führt in Niere und Leber zu einer Erniedrigung des cGMP-Spiegels. In der Milz

wurde eine erhöhte PDE2-Aktivität festgestellt. Der PDE1-Inhibitor Nimodepin, aber nicht der PDE2-Inhibitor EHNA, führte anschließend zu einer signifikanten Abnahme von proliferierenden Zellen in Niere und Leber (Youbare *et al.*, 2014).

Im hier verwendeten Zellmodell isolierter, kultivierter peritubulärer Zellen wird PDE1C unabhängig vom pathologischen Grundzustand der LP von Beginn der Kultivierung stetig über mehrere Passagen exprimiert. Durch die Verwendung verschiedener zellspezifischer Markergene konnte die Reinheit der peritubulären Zellpopulation gezeigt werden. Es lag weder eine Verunreinigung durch Sertoli-, Leydig- oder Keimzellen vor. Daraus lässt sich schließen, dass das Gen PDE1C bei der verdickten LP im Zellverband „stumm“ geschaltet wird, aber in Kultur durch verschiedene Faktoren, z.B. Wachstumsfaktoren im Medium, wieder induziert werden kann. Die wiederkehrende PDE1C-Expression unter Kulturbedingungen lässt außerdem vermuten, dass PDE1C eine Bedeutung bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Zellen einnehmen könnte.

Glatte Gefäßmuskelzellen weisen sich unter physiologischen Bedingungen durch einen Synthese-inaktiven, kontraktilen Phänotyp aus. Nach pathologischen Stimuli wie Atherosklerose oder Restenose nach Angioplastie, kann es zur Änderung des „normalen“ kontraktilen Gefäßmuskel-Phänotyps in einen proliferierenden Phänotyp kommen. Diese Veränderung zeichnet sich u.a. durch eine Abnahme kontraktionsspezifischer Proteine, wie SMA, Myh11, SM22 $\alpha$ , Calponin, Smoothelin, Caldesmon (Beamish *et al.*, 2010) und die Synthese verschiedener Proteine, wie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, aus. Unter Kulturbedingungen sind ebenfalls Phänotyp-Veränderungen von Gefäßmuskelzellen zu beobachten. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings unzureichend geklärt (Rybalkin *et al.*, 1997; Rybalkin *et al.*, 2002; Rybalkin *et al.*, 2003). Zudem ist auch unklar, ob die gesamte Gefäßmuskelzell-Population proliferiert, da der Proliferations- und Differenzierungsmarker Nestin nur in einer Subpopulation von Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden konnte (Saboor, Dissertationsschrift, 2012). Es finden sich auch aktuelle Hinweise in der Literatur, dass multipotente vaskuläre Stammzellen (MVSCs) einen großen Anteil an der Umwandlung des kontraktilen in einen proliferierenden Phänotyp der Gefäßmuskelzellen besitzen (Tang *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013).

Eine wesentliche Rolle bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen könnte PDE1C zugewiesen werden. In vivo war keine PDE1C-Expression in Gefäßmuskelzellen der Thorakalaorta von Neugeborenen und Erwachsenen nachweisbar. Allerdings konnte man in kultivierten Gefäßmuskelzellen in vitro und zusätzlich in proliferationsfähigen Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von ungeborenen Feten in situ PDE1C-Expression zeigen. PDE1A und PDE1B werden beide in Gefäßmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Dagegen ist PDE1A, aber nicht PDE1B auch in proliferierenden Gefäßmuskelzellen nachweisbar (Rybalkin *et al.*, 1997). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PDE1B und PDE1C in Gefäßmuskelzellen verschiedene Funktionen übernehmen. PDE1B-Expression wurde in proliferierenden T-Lymphozyten beschrieben (Kanda *et al.*, 2001). Die Gruppe um Rybalkin (*et al.*, 1997) vermutet, dass allgemein bei der Proliferation einiger Zelltypen die Expression von PDE1-Isoformen benötigt wird, um cAMP und/oder cGMP-Spiegel während des Proliferationsvorgangs sowohl in vivo also auch in Kultur zu regulieren (Rybalkin *et al.*, 1997).

Interessanterweise war PDE1C-Expression bei der genannten Rybalkin-Studie in proliferierenden Gefäßmuskelzellen menschspezifisch, da die Gruppe die PDE1C-in vitro-Resultate nicht für Ratte, Rind und Affe (*Macaca nemestrina*) bestätigen konnten (Rybalkin *et al.*, 1997). Studien von Schermuly und Kollegen (Schermuly *et al.*, 2007) zeigten, dass PDE1C-mRNA und PDE1C-Proteinlevel erhöht waren in Lungengefäßen von menschlichen PAH-Lungenexplantaten. Eine Regulation von PDE1C konnte ebenfalls in einem induzierten PAH-Ratten- und Maus-Modell beobachtet werden. Eine Inhibierung der PDE1C durch den selektiven Inhibitor 8MM-IBMX führte in beiden Tiermodellen zu einer strukturellen Umkehrung der modifizierten Gefäßmuskelzellen. Die Gruppe um Stefan Chan (*et al.*, 2011) konnte ebenfalls im Nagermodell PDE1C-Expression in kultivierten Gefäßmuskelzellen bestätigen. Diese Untersuchungen stützen die These, dass PDE1C in die Proliferation von Gefäßmuskelzellen involviert ist. In kultivierten glatten Muskelzellen des weiblichen Myometriums zeigte PDE1C immunhistochemisch eine nukleäre Lokalisation, wohingegen PDE5A nur im Cytoplasma, nahe des Zentrosoms, aber nicht im Kern zu finden ist. Die Expression von PDE1C im Kern deutet auf eine Rolle im Zusammenhang mit Zellproliferation hin (Dolci *et al.*, 2006). Die Gruppe um Cai (*et al.*, 2011) stellte fest, dass in einem ex vivo-Kulturmodell humaner V. saphena-Explantate die Inhibition der PDE1C durch den PDE1-Hemmer IC86340 zu einem Lysosomen-abhängigen Abbau von Kollagen I führte. Allerdings ist IC86340 kein spezifischer PDE1C-Inhibitor, da dieser

höchstwahrscheinlich konzentrationsabhängig auch die anderen PDE1-Isoformen, PDE1A und PDE1B, hemmt (Miller *et al.*, 2009). Dennoch ist dies ein interessanter Aspekt für Gefäßkulturen. In dem von uns verwendeten peritubulären Zellmodell wird PDE1C *in vitro* exprimiert, obwohl PDE1C *in situ* in verdickter LP fehlte.

Man könnte überprüfen, ob der Einsatz spezifischer PDE1-Hemmer, z.B. Dioclein und 8MM-IBMX, welche in geringen Konzentrationen die PDE1C hemmen könnten, auch in peritubulären Zellen zu einem Abbau von KollagenI führt. Erste Ergebnisse zeigten morphologisch keine Auffälligkeiten bei peritubulären Zellen.

In glatten Gefäßmuskelzellen kann der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel entweder durch Ionenkanäle, wie spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (Gollasch *et al.*, 1998) und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^{+}$ -Kanäle ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (Wang *et al.*, 2014) oder intrazellulär der Zelle durch z.B. die Sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum-calcium-ATPase (SERCA) reguliert werden. Eine Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritts in die Zelle scheint in Gefäßen eine Rolle bei der Vermehrung von extrazellulärer Matrix zu spielen. Zu einer vermehrten Ablagerung von Kollagen kann es bei Krankheiten wie Atherosklerose und Fibrose kommen. Das Verhindern des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms könnte die Kollagen-Synthese reduzieren (Schachter, 1997; Vijayagopal *et al.*, 2001). Allerdings muss erst noch untersucht werden inwieweit die Kontrolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, z.B. im Kontext mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PDE1C, eine Auswirkung auf die Kollagenablagerung in der LP *in situ* hat.

Bei der Proliferation von SMCs sind zyklische Nukleotide von maßgeblicher Bedeutung. cAMP und cGMP sind für ihre Rolle in der Relaxation und Kontraktion von Muskelzellen bekannt. Über verschiedene Signalwege können zyklische Nukleotide die Proliferation von SMCs hemmen (Bornfeldt, 1996). Ein erhöhter cAMP-Spiegel reguliert die Aktivität der PKA, die wiederum die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (Cook *et al.*, 1993; Graves *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993), die p70 S6 Kinase Graves *et al.*, 1993 (Monfar *et al.*, 1995) und die Cyclin-abhängige Kinase 4 (Kato *et al.*, 1994) durch Phosphorylierung hemmen kann. Dies führt zu verminderter Proliferation von Gefäßmuskelzellen (Rybalkin *et al.*, 1997; Rybalkin *et al.*, 2002; Rybalkin *et al.*, 2003). Die Hemmung von PDE1C durch den selektiven PDE1-Inhibitor 8MM-IBMX führte zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Synthese in



menschlichen Gefäßmuskelzellen unter Kulturbedingungen (Rybalkin *et al.*, 1997; Rybalkin *et al.*, 2002; Rybalkin *et al.*, 2003).

In Diskrepanz dazu konnte in Vorarbeiten weder in peritubulären Zellen der normalen noch der verdickten LP Proliferation durch den Proliferationsmarker PCNA *in vivo* nachgewiesen werden. Mit einer positiven Immunreaktion konnten teilende Keimzellen als interne Kontrolle herangezogen werden (Volkman *et al.*, 2011). Vereinzelt PCNA-immunpositive peritubuläre Zellen wurden im Hoden der Maus beschrieben (Werler *et al.*, 2014). In der Literatur lässt sich bislang jedoch kein weiterer Hinweis auf eine Proliferation von peritubulären Zellen der LP des menschlichen Hodens finden. Allerdings ist Proliferation nachweisbar in kultivierten peritubulären Zellen, isoliert von unverdickter und auch verdickter LP. Es zeigte sich eine höhere Proliferation von peritubulären Zellen im Zellmodell nach Zugabe des Prostaglandin-Metabolit 15dPGJ2 (Albrecht *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2010.). Auch in unserem Zellmodell menschlicher LP-Zellen konnten proliferierende Zellen durch eine immunpositive Reaktion mit Ki67 bestätigt werden.

*In vivo* war zudem PDE1C im Keimepithel mit RT-PCR nach LCM lokalisierbar. Das Epithel wurde von Biopsien mit diagnostiziertem SCO-Syndrom und Hypospermatogenese durch LCM isoliert und anhand spezifischer Markergene für Keimzellen (CatSperI) und Sertoli-Zellen (AMH) definiert. Dadurch war es möglich PDE1C eindeutig Sertoli-Zellen zuzuordnen, da Keimzellen im SCO-Syndrom fehlen. Von ausdifferenzierten Sertoli-Zellen im erwachsenen Mann ist bekannt, dass sie nicht mehr proliferationsfähig sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PDE1C nicht nur im Proliferationsprozess eine Rolle spielt, sondern auch andere Funktionen in der Zelle übernimmt. In Mäusen konnte die PDE1C immunhistochemisch in Spermatozyten und runden wie elongierten Spermatiden gezeigt werden (Yan *et al.* 2001). Durch unsere zuvor beschriebene methodische Vorgehensweise zum Nachweis von PDE1C im Keimepithel kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob PDE1C auch in menschlichen Keimzellen exprimiert wird.

Um einen besseren Überblick über weitere Funktionen der PDE1C in peritubulären Zellen der LP im Hoden zu erlangen, können in Zukunft verschiedene Untersuchungen

in unserer Arbeitsgruppe fortgesetzt werden. Man könnte die PDE-Wirkung in peritubulären Zellen auf die Zellteilung mit einem Zellproliferations-Assay (XTT) messen und speziell die PDE1C mit spezifischen PDE1C-Inhibitoren, z.B. Dioclein ( $IC_{50}=3,2\mu M$ ) und 8MM-IBMX ( $IC_{50}=8\mu M$ ) inhibieren (Goncalves *et al.*, 2009). Hierbei sollten die Proliferation der Zellen durch einen PDE1-Inhibitor beeinträchtigt werden. Einen ähnlichen Versuch könnte man mit einem Narben- oder Scratch-Assay und verschiedenen PDE1-Inhibitoren und Konzentrationen durchführen, um den Einfluss auf die Migration zu untersuchen.

Ein weiterer wichtiger Punkt wäre es, PDE1C in Verbindung mit Fibrose-Entstehung zu untersuchen. Dazu wäre es möglich, peritubuläre Zellen von menschlichen Biopsien, die eine verdickte LP aufweisen, zu isolieren und mit TGF $\beta$  (verschiedene Konzentrationen) zu inkubieren. Anschließend ließe sich auf mRNA-Ebene die Veränderung der PDE1C-Expression ermitteln.

Im Verlauf dieser Doktorarbeit war die Entdeckung der unterschiedlichen Expression von PDE1C in unverdickter vs. verdickter LP ein besonderes Ergebnis. PDE1C könnte eine bedeutende Rolle in Verbindung mit fibrotischen Umbauprozessen der Lamina propria des Hodens einnehmen und somit indirekt zum Verständnis männlicher Sub- und Infertilität beitragen.

#### 5.1.3. Verlieren peritubuläre Zellen bei Verdickung ihre kontraktile Funktion?

Der Einfluss fibrotischer Veränderungen der LP und die Rolle der PDEs im Hinblick auf Kontraktions- und Relaxationsprozesse sind bisher kaum geklärt. Derzeit ist ebenfalls unzureichend geklärt, ob peritubuläre Zellen der fibrotisch verdickten LP ihre Kontraktilität verlieren.

Im Alter konnte bei fibrotisch auftretenden Veränderungen der LP bereits eine Abnahme der Desmin-positiven Zellen (Holstein *et al.*, 1996.) und ein Anstieg Vimentin-positiver Zellen belegt werden (Santamaria *et al.*, 1992.; Arenas *et al.*, 1997; Schell *et al.*, 2010). Myofibroblasten konnten demgegenüber in verdickter LP verschiedenen klinischen Hintergrunds wie Kryptorchismus, Orchitis, testikulärer Feminisierung, Prostatakrebs, nach Vasektomie, bei Transsexuellen (durch Azan und eine zusätzliche SMA-Färbung) weiterhin nachgewiesen werden (Volkmann *et al.*,

2012.). Selbst in der LP von Tubuli mit starker LP-Verdickung wurden SMA-positive Zellen nachgewiesen. Die funktionelle Integrität der Myofibroblasten konnte durch kontraktile zellspezifische Strukturproteine wie Myh11 und Calponin belegt werden, welche als Marker für differenzierte kontraktile Zellen dienen (Owens *et al.*, 2004). Die Relaxations-vermittelnden Proteine PKGI und PDE5 konnten zusätzlich in verdickter LP von Tubuli mit verschiedenen Keimzellstörungen nachgewiesen werden.

Immunhistochemische Färbungen an Paraffin-fixierten Hodenquerschnitten, die im Verlauf dieser Arbeit angefertigt wurden, zeigen eine deutliche, gleichmäßig homogene Färbung mit den kontraktile Markern SMA, Calponin und Myh11 an unverdickter und verdickter LP (s. Punkt 4.1.8., Abbildung 16).

In Diskrepanz dazu steht eine Veröffentlichung von Welter (*et al.*, 2013), in der ein teilweiser Verlust von Muskelzell-Proteinen (Myh11, Calponin und PKGI) bei fibrotischer Verdickung der LP beschrieben wurde. Die Untersuchungen erfolgten an Biopsien mit „mixed atrophy“-Syndrom (MA), wobei Tubuli seminiferi mit normaler und gestörter Spermatogenese in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Man weiß über die klinischen Ursachen des MA-Syndroms relativ wenig (Sigg *et al.*, 1981; Nistal *et al.*, 2007). Mit Ausnahme der verschiedenen Hersteller der Antikörper für anti-Myh11, anti-Calponin und anti-PKGI verlief die methodische Vorgehensweise der Fixierung und Einbettung der menschlichen Hodenproben in beiden Arbeiten sehr ähnlich, sowohl die Fixierung in Bouin und Einbettung in Paraffin als auch der immunhistochemische Ablauf.

Ein anderer Grund für die verschiedenen Ergebnisse der beiden Gruppen könnte die unterschiedlich verwendeten AK von verschiedenen Herstellern sein. Trotz positiver interner AK-Kontrollen durch Färbung der vaskulären glatten Muskelzellen könnte die Bindungsaktivität der AK in peritubulären Zellen differieren. Hinsichtlich der Zeit zwischen Organentnahme und Fixierung könnte aber bei den einzelnen Studien Unterschiede vorhanden gewesen sein, die nicht ermittelbar sind.

In beiden Arbeiten konnten verschiedene kontraktile Proteine in Einzelzellen der verdickten peritubulären LP-Wand nachgewiesen werden. Somit könnten die Zellen in vivo kontraktile Funktion ausüben. Allerdings ist bisher ungeklärt, ob bei fibrotisch verdickter LP die Kontraktion des ganzen Tubulus-Gangs noch möglich ist. Dazu

werden momentan in unserer Arbeitsgruppe Kontraktionsversuche an ganzen Tubuli mit normaler und auch verdickter LP durch Videomikroskopie analysiert.

#### 5.1.4 Quantitativer Nachweis von PDE-Isoformen in peritubulären Zellen unterschiedlichen pathologischen Ursprungs

In Verbindung mit Relaxation peritubulärer Muskelzellen und dem cGMP-System lag der Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf den cGMP-degradierenden PDE-Isoformen. In vivo konnten folgende cGMP-hydrolysierenden PDEs sowohl in unverdickter als auch verdickter LP lokalisiert werden: PDE5A, PDE9A; PDE1A, PDE1B, PDE3B und PDE10A. Zusätzlich wurde die cAMP-spezifische PDE8A in der LP nachgewiesen.

Um nachfolgend PDE-Transkripte mit Real-Time-PCR quantifizieren zu können, bedienten wir uns des etablierten Zellmodells kultivierter peritubulärer Zellen (Albrecht *et al.*, 2006). Aufgrund der limitierten Anzahl menschlicher Hodenbiopsien konnten wir in ersten Versuchen zwei Proben mit unverdickter und eine Probe mit verdickter LP in die Auswertungen einbeziehen. Trotz unterschiedlicher Dicke der LP in vivo (unverdickt vs. verdickt) und damit verbunden unterschiedlicher Syntheseaktivität der Zellen, zeigt das mRNA-Level der kontraktilen und Bindegewebsmarker in kultivierten Zellen ein sehr ähnliches Muster der hier untersuchten Moleküle.

In anderen Arbeiten mit isolierten, peritubulären Zellen wurde in vitro eine signifikant höhere Expression von Dekorin und Katalase in Zellen von Biopsien mit gestörter Spermatogenese und fibrotisch verdickter LP (HTPC-Fs) im Vergleich zu Biopsien mit normaler Spermatogenese und unverdickter LP (HTPCs) nachgewiesen (Adam *et al.* 2011). Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass manche Gene trotz veränderten Bedingungen konstitutiv exprimiert werden (z.B. die hier erwähnten PDEs als indirektes Zeichen weiterhin bestehender Kontraktilität der Einzelzellen) und andere Gene einer Regulation (z.B. solche mit Einfluss auf die Synthese von extrazellulärer Matrix-Bestandteilen) unterstehen.

Dekorin kann viele lösliche und unlösliche Liganden binden und deren Aktivität und Verfügbarkeit regulieren. Andererseits kann Dekorin als Ligand für verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren zur Verfügung stehen. Die Funktionen dieses kleinen

Proteoglykane erlaubt es bei Prozessen wie Zellmigration, Adhäsion und Proliferation involviert zu sein (Nili *et al.*, 2003; Ferdous *et al.*, 2010). Dekorin wurde bereits bei fibrotischen Umbauprozessen (PAH und nephrogener systemischer Fibrose) eine Bedeutung zugesprochen (Fadic *et al.*, 2006; Gambichler *et al.*, 2009). Katalase spaltet reaktive Sauerstoffradikale und wurde zuvor bereits in peritubulären Zellen der Ratte beschrieben (Zini *et al.*, 1996; Zini *et al.*, 1997).

Das Expressionsniveau der zuvor genannten PDE-Isoformen (PDE5A, PDE9A; PDE1B, PDE3B, PDE10A und PDE8A) zeigte nur geringe Unterschiede zwischen isolierten, kultivierten Zellen von unverdickter und verdickter LP. Dafür war ein abgestuftes Expressionsmuster der einzelnen PDE-Isoformen zu beobachten.

In kultivierten Zellen der unverdickten LP scheinen PDE1A und PDE5A ein erhöhtes mRNA-Level gegenüber den anderen hier untersuchten PDE-Isoformen über mehrere Passagen hinweg zu haben. Dies könnte darauf hindeuten, dass sowohl cGMP-Signale als auch die damit in Verbindung stehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, welche über cGMP reguliert werden können, in isolierten peritubulären Zellen durch PDEs, wie PDE1A und PDE5A, reguliert werden. Die zugrunde liegenden transkriptionellen Mechanismen dieser beiden PDEs sind in isolierten peritubulären Zellen jedoch noch unbekannt. PDE1A- und PDE5A-Expression wurden im menschlichen Hoden bereits beschrieben (Michibata *et al.*, 2001; Volkmann *et al.* 2011), allerdings war aus der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nichts über die Lokalisierung von PDE1A in glatten Muskelzellen der LP bekannt.

Die Expression von PDE5A kann durch verschiedene Substanzen stimuliert und erhöht werden. Eine Hochregulation der PDE5 nach Gabe von NO und Androgenen ist in anderen Zellen beschrieben worden (Morelli *et al.*, 2004; Schankin *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013).

In Zellen der verdickten LP ist das mRNA-Level von PDE1A jedoch vermindert im Vergleich zu den peritubulären Zellen der unverdickten LP. Zum derzeitigen Zeitpunkt ist es schwer zu erklären, warum die PDE1A-Expression in Zellen der verdickten LP geringer ist im Vergleich zu den Zellen der unverdickten LP. Es ist wenig bekannt über Transkriptionsfaktoren oder Promotoren der PDE1A oder unter welchen Bedingungen die Genexpression reguliert wird. Die PDE1-Isoformen PDE1B und PDE1C sind in

Zellen der unverdickten LP weniger exprimiert als PDE1A. Über PDE1B- und PDE1C-Expression ist generell im humanen Hoden bisher wenig bekannt. Beide PDE-Isoformen sind in der Lage cGMP mit vergleichsweise ähnlicher Affinität zu binden (Francis *et al.*, 2010), wobei PDE1C, wie schon erwähnt, auch cAMP mit gleicher Affinität wie cGMP spalten kann. In der Literatur wurde über eine vorherrschende Expression von PDE1C und PDE5A in glatten Muskelzellen berichtet (Dolci *et al.*, 2006).

PDE9A, die die höchste Affinität aller PDE-Isoformen für cGMP ( $K_m=0,2-0,7\mu M$ ; (Francis *et al.*, 2010) aufweist, ist interessanterweise in isolierten Zellen von unverdickter und verdickter LP quantitativ weniger exprimiert als PDE1A, PDE5A, PDE1C und die cAMP-spezifische PDE8A. Man könnte vermuten, dass aufgrund der hochaffinen Bindung von cGMP weniger PDE9A-mRNA in isolierten Zellen in vitro hergestellt wird. Eine PDE9A-Expression im Hoden wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Hier konnte aber initial in einem PCR-Screening verschiedener humaner Hoden-Biopsien gezeigt werden, dass PDE9A im Hoden exprimiert wird. Durch RT-PCR nach LCM war es uns möglich PDE9A spezifisch in der unverdickten und verdickten LP und sogar Keimepithel zu lokalisieren.

Ein abgestuftes Expressionsmuster der hier quantitativ untersuchten PDE-Isoformen könnte auf verschiedene Funktionen der PDEs in der Zelle und eine verschiedene subzelluläre Verteilung der PDE-Isoformen schließen. Man könnte vermuten, dass in der Nähe von cGMP-Pools nur bestimmte PDE-Isoformen gebraucht und exprimiert werden. Die Organisation von PDEs kann in makromolekularen Komplexen erfolgen. Dies erlaubt eine selektive Phosphorylierung von Target-Proteinen als Antwort auf ganz spezifische, selektive Stimuli in der Zelle. PDEs regulieren die cAMP- und/oder cGMP-Degradation lokal. Je nach Zellspezifität können PDEs im oder in der Nähe des Kerns oder an anderen Zellorganellen exprimiert sein. In Kardiomyozyten sind cGMP-Moleküle nicht gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt, sondern in separaten, ausgeglichenen sogenannten „Pools“ angeordnet. Dies bezieht sich, z.B. auf „cGMP-Pools“, welche in der Nähe der membranständigen GC-Rezeptoren oder im Cytosol nahe der sGC lokalisiert sind. Dementsprechend kontrollieren nur bestimmte PDE-

Subtypen an bestimmten Stellen in der Zelle das cGMP-Signal (Stangherlin *et al.*, 2011; Stangherlin *et al.*, 2012).

Über die spezifische zelluläre Lokalisierung der PDE-Isoformen PDE5A, PDE9A; PDE1A, PDE1B, PDE3B, PDE10A und PDE8A in peritubulären Zellen oder glatten Muskelzellen ist bisher wenig bekannt.

PDE5 scheint in Herzmuskelzellen nur die cytoplasmatischen cGMP-Signale, gebildet durch sGC zu steuern, während PDE2 sowohl an der Membran als auch im Cytosol zu finden ist. Zudem scheint PDE5 vor allem in der Nähe des Sarkolemmas lokalisiert zu sein, um dort spezifisch das cGMP-Signal zu kontrollieren (Castro *et al.*, 2006; Takimoto *et al.*, 2007).

Das cAMP-Signal in Kardiomyozyten wird lokal durch  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren begrenzt. Durch die Überexpression von Caveolin 3 wird dieses Signal nicht mehr lokal begrenzt, sondern breitet sich aus (Wright *et al.*, 2014).

In einem Zellkultur-Modell von Sertoli-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Unterform PDE4D3 mit PKA und dem Ankerprotein AKAP-450 in der Nähe des Zentrosoms kolokalisiert sind, die dadurch einen funktionellen Komplex bilden. Durch cAMP wird PKA aktiviert, die wiederum PDE4D3 phosphoryliert und nachfolgend eine lokale Feedback-Regulation ausgelöst wird (Tasken *et al.*, 2001).

Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen können wir nur eine Aussage über das Expressionslevel der einzelnen PDEs auf mRNA-Ebene, aber nicht auf Protein-Ebene machen. Es sind wenige spezifische PDE-Antikörper für Western-Blot oder Immunhistochemie zugänglich, sodass eine genaue Aussage über PDE-Proteinexpression in peritubulären Zellen derzeit schwierig zu treffen ist. Für die Zukunft könnte man versuchen, eine Protein-Quantifizierung beruhend auf der Trennung nach dem isoelektrischen Punkt durchgeführt mit einer Kapillarelektrophorese und UV-Detektion ([www.proteinsimple.com](http://www.proteinsimple.com)).

Das Expressionsniveau der in dieser Arbeit untersuchten PDE-Isoformen wurde über mehrere Passagen beobachtet. Das mRNA-Level der meisten PDEs bleibt über die untersuchten Passagen bei Zellen der unverdickten LP und bei Zellen der verdickten LP stabil. In Zellen der unverdickten LP zeigt PDE8A eine kleine, aber signifikante

Veränderung in P3 im Vergleich zu P4, P5 und P6, während in Zellen der verdickten LP PDE5A eine signifikante Veränderung von P4 nach P6 zeigt. Bei der geringen Fallzahl ist es für eine abschließende Bewertung dieser Befunde aber noch zu früh.

Bisher wurde das Expressionsmuster peritubulärer Zellen noch nicht über einen Zeitraum mehrerer Passagen gezeigt. Die Gruppe um Mayerhofer benutzten bisher peritubulärer Zellen der Passagen 2-9 (Albrecht *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2008; Schell *et al.* 2010; Welter *et al.*, 2013), zeigten aber bisher nur Daten aus jeweils einer Passage und nicht von mehreren verwendeten Passagen im Vergleich.

#### 5.1.5 Fehlende Expression einiger PDE-Isoformen in der Lamina propria des Hodens

Neben der Expression von PDE-Isoformen in unverdickter und verdickter LP in vivo, konnten einige wenige PDE-Isoformen mit LCM und nachfolgender RT-PCR-Methode weder in unverdickter noch in verdickter LP nachgewiesen werden. Dazu gehören die dual-spezifischen PDE2A, PDE3A und PDE11A. Zusätzlich wurde die cAMP-spezifische PDE8B ebenfalls nicht in der LP exprimiert.

In peritubulären Zellen des Hodens scheint PDE2A somit keine Rolle zu spielen. Die Degradation von cGMP und cAMP werden von anderen PDE-Isoformen übernommen. PDE2A-Expression ist hauptsächlich im Gehirn und Herzen bekannt. Dort ist PDE2A vermutlich in die Regulation von Blutdruck und Flüssigkeitshaushalt durch ANP involviert (Iffland *et al.*, 2005). Eine einzigartige Eigenschaft von PDE2A ist deren Aktivierung über cGMP-Bindung an die regulatorische GAF-Domäne was zum Abbau von cAMP führt.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde immunhistochemisch PDE2A in humanen und bovinen Hoden-Querschnitten nachgewiesen. Dabei konnte PDE2A Spermatiden und Spermatozyten in den Tubuli seminiferi zugewiesen werden. Auch außerhalb des Keimepithels war eine Zuordnung von PDE2A zu Leydig-Zellen und Gefäßen im Interstitium möglich (Mietens, Dissertationsschrift, 2005). Zusätzlich wurde PDE2A-Expression in runden Spermatiden der Tubuli seminiferi von Ratten nachgewiesen beschrieben. Dies unterstützt die These, dass PDE2A wichtig für die Funktion von Keim- und Sertoli-Zellen sein könnte (Welch *et al.*, 1992; Morena *et al.*, 1995). Eine



Expression in isolierten glatten Muskelzellen aus dem Corpus Cavernosum des Penis konnten ebenfalls gezeigt werden (Chung *et al.*, 2012). PDE2A-Expression war auch in Endothelzellen kleiner Kapillaren und Venolen nachweisbar (Mietens, Dissertationsschrift, 2005). Zudem weisen andere unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe auf eine PDE2A-Expression in der Aorta hin.

In Kardiomyozyten übernimmt PDE2 eine Rolle in der Umbildung von Fibroblasten zu Myofibroblasten während Fibroseprozessen. PDE2 wurde sowohl in Herzfibroblasten, als auch in Kardiomyozyten nachgewiesen. Eine Überexpression von PDE2 führte zu einem verminderten cAMP-Spiegel, was wiederum die Transition zu Myofibroblasten induzierte, ohne exogene Zugabe profibrotischer Stimuli. Der cGMP-Spiegel war allerdings nicht betroffen. Durch eine Erhöhung des cGMP-Spiegels kann der PDE2-induzierte Remodeling-Effekt umgekehrt werden. Es wird vermutet, dass cAMP und cGMP als antifibrotische Mittler für protektive Mechanismen bei Herversagen angewendet werden können (Vettel *et al.*, 2014).

PDE2 kann durch cGMP stimuliert, wohingegen PDE3 durch cGMP inhibiert werden kann. Dadurch überschneiden sich die Funktionen dieser beiden Phosphodiesterasen (cross talk). Endothelzellen exprimieren beide PDE-Isoformen. Das cGMP-Signal in Endothelzellen variiert je nach Grad, indem PDE2 aktiviert und PDE3 inhibiert wird (Surapitschat *et al.*, 2007). Die Degradation von cAMP- und cGMP-Signalen mittels dieser beiden zuvor genannten PDEs spielt auch im Herzen eine regulatorische Rolle. Die Inhibition von PDE2 führt über einen Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer Kontraktion der Kardiomyozyten. Ein cGMP-Anstieg führt zu einer erneuten Aktivierung der PDE2 und einer gleichzeitigen Inhibierung der PDE3-Aktivität (Maurice, 2005; Zaccolo *et al.*, 2007).

Eine fehlende PDE3A-Expression in humanen LP-Zellen in vivo deutet darauf hin, dass diese dual-spezifische PDE-Isoform dort nicht relevant zu sein scheint, während PDE3B-Expression in der LP und im Keimepithel nachgewiesen werden konnte. In Übereinstimmung damit wurde die PDE3B zuvor auch schon in Spermatozyten der Maus beschrieben (Laughlin *et al.*, 2010; Reinhardt *et al.*, 1995). Ferner konnten Morena (*et al.*, 1995) durch in-situ-Hybridisierung PDE3-mRNA Sertoli-Zellen zuordnen, ohne allerdings eine Spezifizierung der Isoformen zu nennen. PDE3A, über

die im Hoden bisher keine Arbeiten vorliegen, scheint vornehmlich in anderen Organen den Abbau der zyklischen Nukleotide zu steuern.

PDE11A wird als weitere dual-spezifische PDE-Isoform ebenfalls nicht in der humanen LP exprimiert. Allerdings ist bekannt, dass eine Unterform, die PDE11A3, im Hoden vorkommt, während die PDE11A4 in der Prostata exprimiert wird. Dies spricht für eine gewebsspezifische Expression dieser beiden Subtypen (Loughney *et al.*, 2005). Durch PDE11A3-KO-Mausmodelle konnte man PDE11A3 eine Funktion in Spermien zuordnen, da diese Mäuse eine verminderte Spermienfunktion und Spermatogenese aufwiesen (Wayman *et al.*, 2005). Unsere Daten bestätigen eine Lokalisierung der PDE11A im Keimepithel, die von uns verwendeten Primer erkennen vor allem die Sequenz der PDE11A3.

Die cAMP-spezifisch ausgewiesene PDE8B konnte im Gegensatz zu PDE8A, weder in der LP noch im Keimepithel nachgewiesen werden. Allerdings wurden für beide Isoformen eine Expression im Hoden beschrieben, speziell in Leydig-Zellen (Tsai and Beavo 2011). Aus diesem Grund haben wir die Expression von PDE8B in isolierten Interstitium-Arealen durch LCM überprüft. Durch die Verwendung eines Leydig-Zellmarkers (CYP19A) konnten wir PDE8B Leydig-Zellen zuordnen. PDE8A und PDE8B kontrollieren an verschiedenen Stellen in der Zelle cAMP-„Pools“. PDE8A wurde spezifisch in der Nähe von Mitochondrien beschrieben, wohingegen PDE8B verbreiteter im Cytosol exprimiert wird. Diese verschiedenen Verteilungen der beiden Isoformen innerhalb der Zellen könnten für eine unterschiedliche Aktivierung durch PKA sprechen. Diese Aktivierung könnte wiederum verschiedene Downstream-Regulationen auslösen (Shimizu-Albergine *et al.*, 2012). Dyson *et al.*, (2009) zeigten z.B.: dass PKA-TypI die mRNA-Synthese des steroidogenic-acute-regulatory-protein (STAR)-Gens beeinflussen kann, wohingegen PKA-TypII vorherrschend die Phosphorylierung des STAR-Proteins in Leydig-Zellen reguliert.

#### 5.1.6 Verhältnis von Bindegewebs- und kontraktilen Markern im Zellmodell peritubulärer Zellen

Um die Muskelzell-Charakteristika der Zellen in Kultur genauer zu beschreiben, haben wir typische Marker für die quantitative Analyse durch Real-Time-PCR ausgewählt. Ein spezifischer Marker für glatte Muskelzellen ist SMA, welcher bereits vielfach zur Bestimmung von Myofibroblasten der LP im Hoden (Volkmann *et al.*, 2011) und auch bei kultivierten peritubulären Zellen eingesetzt wurde (Schell. *et al.*, 2010). Als weitere kontraktile Marker wurden Calponin (Romano *et al.*, 2007), Smoothelin, Myh11 (Schell. *et al.*, 2010; Welter. *et al.*, 2013.) und PKGI ausgewählt (Volkmann *et al.*, 2011; Welter *et al.*, 2013.). Wie zuvor mehrfach erwähnt wurde, exprimieren Myofibroblasten neben kontraktilen Elementen auch Bindegewebsproteine, sodass eine Charakterisierung peritubulärer Zellen auch über diese Proteine erfolgen muss. Als Marker für Bindegewebszellen wurde CD90 eingesetzt, welches sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in humanen peritubulären Zellen nachgewiesen wurde (Albrecht *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2010). Als weitere charakteristische Marker wurden KollagenI (Albrecht *et al.*, 2006), Vimentin (Gülkesen *et al.*, 2002; Arenas *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 2012) und Fibronektin (Maekawa *et al.*, 1996) ausgewählt.

Ein interessanter Aspekt unserer Untersuchungen ist, dass das Expressionsmuster der kontraktilen Marker (SMA, PKGI, Myh11, Calponin, Smoothelin) und Bindegewebsmarker (CD90, Vimentin, KollagenI, Fibronektin) sowohl in peritubulären Zellen der unverdickten als auch der verdickten LP vergleichbar ist. Daraus könnte man schließen, dass die Syntheseaktivität der peritubulären Zellen *in vitro*, bezogen auf die hier untersuchten Marker, unabhängig vom Grad der Kollagensynthese dieser Zellen präoperativ *in vivo* ist. Welter (*et al.*, 2013) konnten bei Reduzierung auf eine untersuchte Passage ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Myh11, Calponin und PKGI in isolierten peritubulären Zellen von Patienten ohne pathologische Auffälligkeiten (HTPCs) und von Patienten mit gestörter Spermatogenese und fibrotischen Veränderungen (HTPC-Fs) feststellen.

Überraschenderweise war das quantitative Verhältnis der Bindegewebsmarker Vimentin und Fibronektin deutlich erhöht gegenüber den kontraktilen Markern in peritubulären Zellen, sowohl der unverdickten als auch verdickten LP. Aus der Literatur ist bekannt,

dass Vimentin in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommt (Fuchs *et al.*, 1994). Vimentin wird vor allem als Marker für Bindegewebszellen, in der Pathogenese, aber auch für Weichgewebstumore verwendet. Bei krebsartigen Gewebsentartungen neigen Epithelzellen dazu ihre epithelialen Eigenschaften zu verlieren und dazu überzugehen mesenchymale Eigenschaften zu entwickeln. Diesen Vorgang nennt man epithelial-mesenchymale Transition (EMT). EMT steht ebenfalls in Verbindung mit Wundheilung und Fibrose (Satelli *et al.*, 2011). Durch externe Zugabe von TGF- $\beta$  kann EMT auch in Zellkultur-Versuchen ausgelöst werden (z.B. Vervoort *et al.*, 2013). Erhöhte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen und damit in Verbindung stehende Fibrosevorgänge können durch TGF- $\beta$  induziert werden (Penttinen *et al.*, 1988; Boo *et al.*, 2013; Leask, 2013; Mancini *et al.*, 2014). In unserer Arbeitsgruppe werden aktuell Zellkultur-Versuche mit isolierten peritubulären Zellen und zusätzlicher TGF- $\beta$ -Gabe durchgeführt mit dem Gedanken, dass der Myofibroblasten-Phänotyp stärker ausgebildet sein würde. Ein verändertes Expressionsniveau der Muskelzellen gegenüber den Bindegewebsmarkern wird dabei erwartet.

In Zellmodellen mit isolierten Bindegewebszellen, in denen fibrotische Prozesse analysiert wurden, sind Transkriptionslevel von extrazellulären Matrixproteinen oft erhöht (Challa *et al.*, 2012; Eckes *et al.*, 1996; Lindquist *et al.*, 2000; Tsukada *et al.*, 2006). Die Kollagenexpression zum Beispiel ist maßgeblich abhängig von der Stabilität der Kollagen-mRNA (Krupsky *et al.*, 1997; Ricupero *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Vimentin zur Stabilisierung von Kollagen-mRNA in humanen Lungen-Fibroblasten und HEK-Zellen beiträgt (Challa *et al.*, 2011). Ob dies in peritubulären Zellen zutrifft, muss noch untersucht werden.

SMA ist ein Strukturprotein und dient als Bestandteil des Cytoskeletts der Stabilisierung der Zellform. Außerdem ist es zusammen mit Myosin Teil des Kontraktionsapparates. Unter Zellkulturbedingungen ist auf mRNA-Ebene die Expression des kontraktiven Markers SMA geringer im Vergleich zu Vimentin und Fibronectin, sowohl in Zellen der verdickten als auch der unverdickten LP. Aber die SMA-Expression ist vergleichbar mit der Expression von KollagenI und CD90. Die Menge an SMA-mRNA nimmt in peritubulären Zellen, isoliert aus unverdickter LP von P3-P6 betrachtet, signifikant ab.

In Zellen der verdickten LP war keine Abnahme der SMA-mRNA über mehrere Passagen zu beobachten.

Erste Proteindaten unserer Arbeitsgruppe zeigen keine Abnahme von SMA über mehrere Passagen. Die Funktion des Proteins bleibt demnach erhalten, aber die mRNA könnte in Zellen der unverdickten LP einer Regulation unter Kulturbedingungen unterliegen. Vimentin konnte mit Western Blot-Versuchen ebenfalls gleichmäßig über mehrere Passagen nachgewiesen werden.

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die vorliegenden Ergebnisse des Zellmodells erste Versuche darstellen sollten, um Hinweise auf charakteristische Merkmale auswachsender Zellen menschlicher Hodenbiopsien zu erhalten. Dafür konnten lediglich Biopsien von zwei Probanden mit unverdickter LP und eines Probanden mit verdickter LP in Zellkultur-Versuchen untersucht werden. Zellen verändern in Kultur oft ihre biologischen Funktionen und Syntheseaktivitäten. Vor allem zeichnen sich Zellen in Kultur vorherrschend durch Proliferation und Migration aus. Die Synthese von Kollagen scheint bei unseren in vitro-Bedingungen in peritubulären Zellen von geringerer Bedeutung zu sein als die Synthese von Vimentin und Fibronectin.

#### 5.1.7 Vergleich der verwendeten Markergene mit „klassischen“ Muskelzellen

Die überraschende Erkenntnis der höheren Expression von Vimentin und Fibronectin gegenüber kontraktile Markern führte zu der Frage: Sind die hohen Expressionslevel von Vimentin und Fibronectin ein typisches und vor allem spezifisches Merkmal für peritubuläre Zellen?

Um dies zu klären, wurden Gene kontraktiler und Bindegewebsmarker quantitativ in „klassischen“ kultivierten Muskelzellen (HPASMCs und HPrSMCs) mit Real-Time-PCR überprüft. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte sich zwischen peritubulären Zellen und diesen beiden „klassischen“ Muskelzellen. Somit ist die vergleichsweise höhere Expression von Vimentin und Fibronectin kein Spezifikum peritubulärer Zellen mit ihrer in vivo vorhandenen großen Kollagen-Synthese, sondern ist auch charakteristisch für „klassische“ Muskelzellen in vitro.

Verschiedene Signalwege, die mit Fibrose in Zusammenhang stehen, wurden bereits in HPASMCs untersucht, sodass Faktoren, welche sowohl in peritubulären Zellen als auch in HPASMCs exprimiert werden, unter dem Aspekt von Fibrose in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden können. Endothelin-1 vermittelt Vasokonstriktion, sowohl im Hoden, als auch in der Lunge. Veränderungen des Endothelin-1-Signalweges könnten Stimuli für die Induzierung von PAH darstellen, sodass eine Inhibition bestimmter Faktoren dieses Signalwegs ( $K^+$ -Kanal TASK1) ein therapeutisches Ziel in der Behandlung gegen PAH sein könnte (Seyler *et al.*, 2012). Die Rolle von cAMP wurde in Hypoxie-induzierten Mäusen und isolierten HPASMCs dieser Tiere untersucht. Die durch Hypoxie-induzierte Proliferation konnte durch den PDE3-Inhibitor Cilostamid vermindert werden (Chen *et al.*, 2012).

Wie schon einige Male erwähnt wurde, wird das Cytokin TGF- $\beta$  in der LP des Hodens (Holstein *et al.*, 1996; Volkmann, Dissertationsschrift 2010), aber auch in HPASMCs (Ismail *et al.*, 2009) und in HPrSMCs exprimiert (Wu *et al.*, 2008). Für vergleichende Expressionsstudien werden zurzeit Versuche mit TGF- $\beta$  und den hier diskutierten Muskelzell-Kulturen zum Vergleich geplant.

#### 5.1.8 Analyse des Phänotyps peritubulärer Zellen der unverdickten und verdickten Lamina propria

Unter Kulturbedingungen konnte man auf mRNA-Ebene gleichermaßen Eigenschaften für Muskel- als auch Bindegewebsanteile in allen Zellen nachweisen. Nun stellt sich die Frage, ob die zugehörigen Proteine von separaten Zellpopulationen, d.h. Muskelzellen und Bindegewebszellen oder nur von einem Zelltyp, d.h. Myofibroblasten, exprimiert werden. Fluoreszenz-immunhistochemische Untersuchungen mit einem Marker für Muskelzellen (SMA) und einem Marker für Bindegewebszellen (Vimentin) deuten darauf hin, dass alle peritubulären Zellen in Kultur einen Myofibroblasten-Phänotyp ausbilden. Der Myofibroblasten-Phänotyp wurde durch die Kolo-kalisation des Muskelzellmarkers Calponin mit dem Bindegewebsmarker CD90 in einer Zelle bestätigt.

Während alle Zellen CD90 exprimieren, kann nur in einem Teil dieser Zellen gleichzeitig Calponin nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass SMA als allgemeiner smooth-muscle-Marker gilt, während Calponin eher als

Marker für mehr differenzierter Muskelzellen gibt (Bajpai *et al.*, 2012; di Gioia *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). Bei standardisierten Fluoreszenz-IHC-Versuchen wurden die Zellen nach der Passagierung in Wells nochmals 24h im Brutschrank inkubiert, um das Festsetzen der Zellen am Boden zu sichern (s. Punkt 2.6.1). IHC-Vorversuche, die in dieser Doktorarbeit nicht gezeigt wurden, deuteten an, dass eine längere Kultivierung der Zellen (drei Tage) nahezu in jeder Zelle zu einer Kolo-kalisation von CD90 und Calponin führt. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei verlängerter Kulturdauer fast keine Zellen mehr proliferieren und somit alle Zellen einen differenzierten, kontraktile Phänotyp aufweisen.

Alle Zellen waren CD90-immunpositiv. CD90, auch als Thy-1 bekannt, ist ein Membranprotein und wird in vielen Zelltypen, wie T-Zellen, Thymozyten, Neuronen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. Dieses Glykoprotein spielt immunologisch eine große Rolle bei der T-Zellaktivierung. Daneben hat CD90 auch nicht-immunologische Funktionen, z.B. Signalweiterleitung bei Apoptose, Zelladhäsion und Migration. Es reguliert unter anderem Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und steuert in Fibroblasten Proliferation und Migration (Rege *et al.*, 2006). Immunhistochemische Untersuchungen im CD90<sup>-/-</sup>-Mausmodell und von Menschen mit idiopathischer PAH, zeigten eine Korrelation zwischen dem Fehlen von CD90 in Fibroblasten und einem ausgeprägtem fibrotischen Phänotyp *in vivo* und auch *in vitro*-Zellkulturen. Diese Erkenntnis scheint ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung der Fibrogenese der Lunge zu sein. CD90-negative Fibroblasten reagieren sensitiver auf Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) und die Proliferation der Fibroblasten wird dadurch selektiv gefördert. Dadurch kann es zur Akkumulation von Fibroblasten in sogenannten fibrogenen Läsionen kommen. CD90 stellt also einen wichtigen Regulator der molekularen Pathogenese in Fibroblasten dar (Hagood *et al.*, 2005; Ramirez *et al.*, 2011). Die universelle Expression von CD90 in peritubulären Zellen spricht also für einen intakten Bindegewebs-Charakter unter Zellkultur-Bedingungen.

Zusätzlich zur generellen Charakterisierung der peritubulären Zellen durch spezifische Marker für Muskel- und Bindegewebszellen, führten wir Untersuchungen zu Zellwachstum und Zellteilung durch. Als typischer Marker für Zellproliferation wurde Ki67 (Scholzen *et al.*, 2000) während der Fluoreszenz-IHC eingesetzt. In allen

untersuchten Passagen der Zellen von unverdickter und auch verdickter LP war Zellteilung festzustellen. Allerdings teilte sich nur eine Subpopulation der Zellen. Der Marker Ki67 wurde dabei in zwei verschiedenen Antikörper-Kombinationen eingesetzt, einmal in Verbindung mit dem Muskelzellmarker SMA und einmal zusammen mit dem Bindegewebsmarker Vimentin. Unterschiede in der Proliferation zwischen Vimentin+Ki67 und SMA+Ki67 lassen sich durch methodisch bedingte leichte Unterschiede erklären. Es wurden zwei unterschiedliche Zweit-Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzen für den Ki67-Nachweis verwendet. In der Kombination SMA+Ki67 ist Ki67 rot, während Ki67 in Verbindung mit Vimentin grün leuchtet.

Die Biopsien stammen von unterschiedlichen Menschen. Dies könnte eine Ursache für die Unterschiede in der Proliferationsrate der Zellen sein.



## 5.2 Nebenhoden:

### 5.2.1 Lokalisation und Funktion von PDEs im NH-Gang

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift standen einige kommerzielle PDE-Inhibitoren zur Verfügung. Deshalb waren wir im Hinblick auf funktionelle Studien an der Lokalisation von cGMP-regulierenden PDEs (PDE1, PDE2, PDE3A, PDE3B und PDE5) in der Muskelschicht des NH-Gangs der Ratte interessiert. Zusätzlich konnten wir durch Real-Time-PCR-Analysen eine quantitative Aussage über die Verteilung der einzelnen PDEs in Caput, Corpus und Cauda treffen.

Für den proximalen Cauda-Bereich der Ratte konnte eine spontane und peristaltische Aktivität der glatten Muskelzellen des Nebenhodenganges gezeigt werden, die durch ein sich periodisch wiederholendes Kontraktionsmuster (1-13 Kontraktionen pro Minute) charakterisiert ist. Ohne zusätzliche Anregung war die Frequenz der Kontraktionen gleichmäßig. Parallel zu dieser Dissertationsschrift fanden wir eine Stimulation des cGMP-bildenden Rezeptors GC-A durch die Zugabe von ANP, was zu einer Abnahme der Kontraktionsfrequenz führte (Mietens *et al.*, 2012). Zuvor erfolgten bereits Untersuchungen des Kontraktionsmusters in verschiedenen Regionen des Nebenhodens am Bullen. In den Abschnitten Caput, Corpus und Cauda konnten in Abwesenheit externer stimulierender Agenzien, dauerhafte gleichmäßig rhythmische Spontankontraktionen beobachtet werden (Mewe *et al.*, 2006).

#### 5.2.1.1 PDE5

Mit der von uns weiterentwickelten Methode der LCM und nachfolgender RT-PCR in Kombination mit spezifischen Markergenen war es uns möglich, die PDE5 der Muskulatur des NH-Gangs von Mensch und Ratte zuzuordnen. Immunhistochemische Daten unserer Arbeitsgruppe unterstützen die mRNA-Daten auf Proteinebene. Während der Vollendung dieser Doktorarbeit, konnten diese Daten publiziert werden (Mietens *et al.*, 2012). Wie bereits erwähnt, wurde PDE5-Expression in glatten Muskelzellen beschrieben, z.B. im Corpus cavernosum des Penis (Albersen *et al.*, 2013), den Lungengefäßen (Guazzi *et al.*, 2007), und in peritubulären Zellen der LP des humanen Hodens (Volkmann *et al.*, 2011).

In der Ratte war PDE5-Expression in allen drei Regionen des NH (Caput, Corpus und Cauda) nachweisbar. Die PDE5-mRNA-Expression ist von Caput nach Corpus stabil. Interessanterweise zeigen unveröffentlichte Proteindaten unserer Arbeitsgruppe eine leichte Abnahme der PDE5-Proteinexpression von Caput nach Cauda in der cytosolischen Fraktion (Mirjam Hildebrandt; unveröffentlichte Daten der Dissertationsschrift). Momentan kann noch keine Aussage über die Diskrepanz der mRNA- und Proteindaten gemacht werden. Weitere Untersuchungen müssen dazu folgen.

In unseren Organbadstudien konnte die PDE5 spezifisch nach Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil gehemmt werden. Ein Vergleich der Literatur zeigt, dass die  $IC_{50}$ -Werte von Sildenafil variieren. Der  $IC_{50}$ -Wert ist neben vielen anderen Faktoren abhängig von der cGMP-Konzentration und dem verwendeten Gewebe. Es wurden Werte zwischen 3,5-8,5nM angegeben (Gresser *et al.*, 2002; Pauvert *et al.*, 2003; Wallis *et al.*, 1999). In unseren Experimenten wurde nach Anfertigung einer Dosis-Wirkungskurve eine höhere Konzentration von Sildenafil eingesetzt, um einen sichtbaren relaxierenden Effekt im Organbad zu erzielen. Dies resultierte in einer deutlichen Verlangsamung der spontanen Aktivität der Muskelzellen im Organbad. Nach externer Zugabe von cGMP und erwarteter Verlangsamung der Muskelkontraktion, konnte durch weitere Gabe von Sildenafil eine zunehmende Relaxation der Muskelzellen gezeigt werden. Einige wenige Ausschläge bleiben nach Sildenafil-Gabe jedoch erhalten. Eine komplette Blockierung des Kontraktionsmusters war durch den nicht-selektiven PDE-Inhibitor IBMX möglich, was auf Vorhandensein und Bedeutung weiterer PDEs in der Muskelschicht schließen lässt.

In einem assoziierten Projekt konnte mit einem Sildenafil-Langzeit-Modell gezeigt werden, dass die Spontankontraktion des NH-Gangs bei Tieren mit täglicher, regelmäßiger Sildenafil-Gabe keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zeigte. Dies deutet darauf hin, dass chronische Sildenafil-Gabe keine dauerhaften Auswirkungen auf die autorhythmische Kontraktilität der Muskelzellen des D. epididymidis hat (Mietens *et al.*, 2012).

Sildenafil, wie auch die verwandten Komponenten Tadalafil oder Vardenafil, werden weltweit zur Behandlung erektiler Dysfunktion eingesetzt (Lacchini *et al.*, 2014; Zelefsky *et al.*, 2014). Eine hohe Expression von PDE5 in Gefäßen der Lunge ist bekannt, sodass Sildenafil vielfach auch für die Therapie gegen PAH Einsatz findet (Lee *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Yaseen *et al.*, 2012). Auch bei Herzkrankheiten finden sich Therapiemöglichkeiten für die Verwendung von Sildenafil (Borgdorff *et al.*, 2014; Carls *et al.*, 2014). Seitdem das Patent für Sildenafil (Viagra) beim Hersteller Pfizer im Juni 2013 abgelaufen ist, kann der Wirkstoff finanziell günstiger in anderen Konkurrenzprodukten verwendet und auch für andere Therapien eingesetzt werden. PDE5 weist in der Blase hohe Expressionen auf (Fibbi *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2011). Seit kurzem darf Sildenafil bei Symptomen des unteren Harntraktes (engl. lower urinary tract symptoms, LUTS) angewendet werden (Scheepe *et al.*, 2014). In naher Zukunft werden ebenfalls die Patente für Levitra (Vardenafil) der Firma Bayer (im Jahr 2015) und Cialis (Tadalafil) der Firma Lilly (im Jahr 2016) auslaufen.

#### 5.2.1.2 PDE3

Im Gegensatz zu PDE5 waren die Isoformen PDE3A als auch PDE3B nicht im humanen NH nachweisbar. Dies scheint ein speziesspezifisches Phänomen zu sein, denn in isolierter Muskelschicht des Ratten-NH waren beide PDE3-Isoformen zu finden.

In unseren quantitativen Untersuchungen scheinen PDE3A- und B sowie PDE5 im NH der Ratte über ähnliche mRNA-Expression zu verfügen. Die Verteilung der mRNA ist von Caput nach Cauda stabil und scheint auf einem vergleichbaren mRNA-Expressionsniveau zu sein. PDE5 zeigt sich für die Terminierung des cGMP-Signals verantwortlich, während PDE3 beide zyklischen Nukleotide degradieren kann (Ahmad *et al.*, 2014; Movsesian *et al.*, 2011). Somit übernimmt jede dieser Isoformen eine ganz spezielle Funktion im NH-Gang.

In dieser Doktorarbeit konnte in funktionellen Kontraktionsstudien gezeigt werden, dass die spezifische Inhibierung der PDE3 durch den Inhibitor Trequinsin einen relaxierenden Effekt der Muskelschicht des NH-Gangs hat. Experimente mit einem anderen PDE3-Inhibitor Milrinon offenbarten ebenfalls eine Suppression der Spontankontraktion im Bullen (Mewe *et al.*, 2006). Eine Inhibition der PDE3 durch Trequinsin führte in bovinen Oozyten zum Meiosearrest (Bilodeau-Goeseels, 2003). In

isolierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere führte eine PDE3-Inhibition durch Trequinsin zu einem cAMP-Anstieg und zu einer stimulierten Renin-Ausschüttung (Friis *et al.*, 2002).

PDE3A wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht im männlichen Reproduktionstrakt beschrieben. PDE3B hingegen wurde bereits in Spermatozyten nachgewiesen (Reinhardt *et al.*, 1995), aber über eine Expression im NH war bis zum Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

Der speziesspezifische Unterschied von PDE3A und -B war ein interessantes Ergebnis und könnte verschiedene Ursachen haben. PDE3 baut als dual-spezifische PDE primär cAMP ab und kann durch cGMP inhibiert werden. In glatten Muskelzellen der Aorta führte eine Erhöhung der cGMP-Konzentration durch CNP zu einer Inhibierung der PDE3. Daraufhin kam es zum Anstieg des cAMP-Spiegels. Durch die Aktivierung der PKA kam es zur Phosphorylierung des GC-A-Rezeptors, was letztendlich zu einer ANP-Aktivitätserhöhung führte. Diesen Vorgang nennt man „GC-A-Sensitisierung“ (Waisbrod, Dissertationsschrift, 2011).

PDE3A wird eine Funktion bei der Reifung der Oocyte im weiblichen Genitaltrakt und auch in vaskulären glatten Muskelzellen zugesprochen (Tilley *et al.*, 2002; Begum *et al.*, 2011). In PDE3A-KO-Mäusen führte das Fehlen von PDE3A zu einer verminderten Mitogen-induzierten Proliferation von kultivierten Gefäßmuskelzellen durch die Suppression der G<sub>1</sub>-Phase zur Synthese-Phase und der G<sub>2</sub>-Phase zur Mitose-Phase des Zellzyklus. Das reduzierte Wachstum wurde begleitet von einer signifikant verminderten Phosphorylierungsaktivität der signal-regulated-kinase (ERK). Dafür wurde eine höhere Basal-Aktivität der PKA und verschiedener Transkriptionsfaktoren gemessen, z.B. CREB und anderer involvierter Proteinen [p53, p21, Cyclin-D1, Retinoblastomprotein (Rb)] (Begum *et al.*, 2011).

In Patienten mit einem Ductus arteriosus-abhängigen Herzfehler (congenital-heart-disease; CHD) führte eine Inhibierung der PDE3 mit den Inhibitoren Milrinon und Olprinon zu einer Erweiterung der Gefäße und somit zu einer verbesserten

Atemfähigkeit ohne Apnoe. Zudem war der Effekt durch PDE3-Inhibition größer als durch Zugabe von Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) (Ichikawa *et al.*, 2012).

#### 5.2.1.3 PDE1

PDE1 konnte ebenfalls in der Muskelschicht des NH spezifisch durch die LCM-Methode lokalisiert werden. Auf mRNA-Ebene war mit Quantifizierungsstudien eine signifikante Abnahme der PDE1-Expression von Caput nach Cauda zu beobachten. Zudem war das Expressionslevel von PDE1 von allen hier untersuchten PDEs im Caput am höchsten. PDE1 scheint demnach eine größere Funktion als die weiteren untersuchten PDE2, PDE3A und -B und PDE5 im NH-Caput zu übernehmen.

PDE1-Inhibition konnte in dieser Arbeit mittels Organbadstudien durch Dioclein (Spearing *et al.*, 1997) gezeigt werden. Die Spontankontraktion konnte durch diesen PDE1-Inhibitor eindeutig supprimiert werden.

Inhibitoren, die an die katalytische Stelle eines Enzyms binden, wie Vinpocetin und 8MM-IBMX, hemmen die PDE1-Aktivität, haben jedoch eine limitierte Wirksamkeit und fehlende Selektivität für die PDE1-Isoformen. Vinpocetin hat einen IC<sub>50</sub>-Wert von 10-100µM, abhängig von der PDE1-Isoform (Beavo *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997), während 8-MM-IBMX eine höhere Selektivität für PDE1 (IC<sub>50</sub>=8 µM) aufweist.

Der von uns verwendete PDE1-Inhibitor Dioclein ist ein Flavonoid und wurde von Goncalves (*et al.*, 2009) als Calmodulin-unabhängiger PDE1-Inhibitor beschrieben. Der IC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 3,2µM. Dioclein ist somit nur geringfügig selektiver gegenüber PDE1 als 8-MM-IBMX (IC<sub>50</sub>=8 µM).

Dioclein wurde auch in anderen Organen als spezifischer Inhibitor für PDE1 eingesetzt. In glatten Gefäß-Muskelzellen der Rattenaorta löst PDE1-Hemmung einen Endothel-abhängigen vasodilatorischen Effekt aus (Gonçalves *et al.*, 2009).

PDE1-Expression in NH-Epithelzellen wurde nicht von uns untersucht. Allerdings wurde eine Expression von PDE1 in Epithelzellen der Lunge und des Darms beschrieben (Brown *et al.*, 2007; O'Grady *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt, ist die

PDE1 die einzige PDE, deren Aktivität durch  $\text{Ca}^{2+}$  gesteigert wird. Die Epithelzellen des NH sezernieren viele verschiedene Proteine ins Lumen, die mit der Oberfläche der Spermien interagieren können. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spielt im NH eine große Rolle in Bezug auf die Reifung und Funktion der Spermien. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Lumen nimmt deutlich in den distalen Segmenten des NH ab. In den NH-Epithelzellen ist die Expression verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Kanäle bekannt. Die membranspannenden Kanäle TRPV5 und TRPV6, die zur transient-receptor-potential-(TRP)-Kanalfamilie gehören, regulieren den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Epithelzellen des NH. Ein Austausch einer spezifischen Aminosäure oder die Deletion des TRPV6-Gens verursacht in Mäusen eine gestörte Fertilität, Motilität und Viabilität von Spermien und erzeugt einen signifikanten Anstieg der luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in NH und Prostata (Weissgerber *et al.*, 2011). Es existieren zusätzlich andere Transportsysteme im NH zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation, wie z.B. die Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PCMA),  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle (CACC) (Huang *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2013; Triphan *et al.*, 2007).

Zudem sind auch in Spermien verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierende Kanäle bekannt, wie spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, CNG-Kanäle, CatSperI-IV, sowie auch TRP-Kanäle. Hohe extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Spermien führen über die PKA zur Phosphorylierung von Tyrosin mehrerer Spermienproteine und sind dadurch in den Vorgang der Kapazitation involviert (Ecroyd *et al.*, 2004). In der Literatur existieren Hinweise, dass eine niedrige cAMP- und eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Spermien des Caputbereichs eine Ursache für die Immotilität unreifer Spermien sein kann (Baker *et al.*, 2003). Dazu würden unsere mRNA-Daten einer hohen PDE1-Expression im Caput passen, um das cAMP-Signal in der Caputregion spezifisch zu terminieren.

Es gibt sogar Hinweise, dass PDE1A in einem stabilen Komplex mit Calmodulin und PDE3A in Spermien existiert. Beide könnten eine Rolle bei der Regulation der Spermienmembran spielen, was wichtig wäre für den Vorgang der Kapazitation oder Akrosomreaktion. Zudem wurde PDE1A auch im Haupt- und Mittelstück von Spermien nachgewiesen, was auf eine Rolle bei der Spermienmotilität hindeuten könnte (Lefievre *et al.*, 2002).

#### 5.2.1.4 PDE2

Unsere quantitativen PDE2A-mRNA-Daten zeigen ein auffälliges Expressionsmuster im NH. Die höchste Expression wurde im Corpusbereich dokumentiert, wohingegen die Expression in Caput und Cauda signifikant geringer war. Unsere mRNA-Daten passen mit unveröffentlichten Protein-Daten unserer Gruppe zusammen (Hildebrandt, unveröffentlichte Daten. Dissertation).

Frühere immunhistochemische Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine unregelmäßige Epithelfärbung von PDE2A im D. epididymidis. Dies führt zur Vermutung, dass PDE2A eine Rolle bei der Spermienreifung und bei der Sekretion von Faktoren im NH-Epithel, die zur Reifung von Spermien führen, einnehmen könnte (Mietens, Dissertationsschrift, 2005). Im Hoden wurde PDE2A-Expression bereits diskutiert. PDE2A-Expression wurden in Spermatozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien nachgewiesen (Morena *et al.*, 1995; Welch *et al.*, 1992). Man vermutet, dass PDE2 eine Funktion in Reifung und Differenzierung von Keimzellen ausübt. Zusätzlich wurde PDE2 in Leydigzellen, speziell im Cytosol, lokalisiert (Andrea Mietens Dissertationsschrift, 2005).

PDE2 konnte anhand von RT-PCR nach LCM in der Muskelschicht des NH-Gangs der Ratte isoliert werden. Es war möglich die Muskelkontraktionen des NH-Gangs in Organbadstudien mit dem spezifischen PDE2-Inhibitor BAY60-7550 zu hemmen. Aus der Literatur ist bekannt, dass BAY60-7550 eine 50-fach höhere Selektivität gegenüber PDE2 zeigt im Vergleich zu PDE1, und eine mehr als 100-fach höhere Selektivität im Vergleich zu PDE3B, PDE4B, PDE5, PDE7B, PDE8A, PDE10A und PDE11A (Rutten *et al.*, 2007).

### 5.2.2 Lokalisation von Faktoren des NO/cGMP-Systems im Nebenhoden des Menschen und der Ratte

Relaxationsprozesse in der Muskelschicht des NH werden vorwiegend durch Komponenten des NO/cGMP-Signalsystems reguliert. Funktionelle Kontraktionsstudien und Proteindaten in Rind, Ratte und auch Mensch, welche innerhalb unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, gaben einen guten Einblick über Expression und Aktivität der einzelnen involvierten Proteine des NO/cGMP-Systems. Expressionsdaten im NH von eNOS, sGC, GC-A, GC-B und PKGI wurden bereits publiziert. Diese Enzyme vermitteln relaxierende Effekte, die distal zum Cauda stark zunehmen (Mewe *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2011; Mietens *et al.*, 2012; Mietens *et al.*, 2014).

Bis zum Beginn dieser Doktorarbeit, fehlten detaillierte Aussagen über regionale und zelluläre Lokalisation der cGMP-regulierenden Faktoren im NH der Ratte. Zuerst haben wir uns einen allgemeinen Überblick über die Expression einiger cGMP-bildender und -regulierender Komponenten in den einzelnen Abschnitten des NH, Caput, Corpus und Cauda verschafft, um anschließend präzise in der Muskelschicht des NH-Gangs die Lokalisation dieser Proteine zu bestimmen.

Die Expression der cGMP-bildenden, membranständigen Rezeptoren GC-A und GC-B, sowie der cytosolisch-lokalisierten sGC und der Clearance-Rezeptor NPR-C (bindet ANP, BNP und CNP), waren in allen drei Bereichen des NH der Ratte nachweisbar. Die mRNA-Daten konnten durch unveröffentlichten Proteindaten (WB) unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Hildebrandt, Dissertationsschrift). Die GC-A-Expression nimmt von Caput nach Cauda, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu. Dies lässt sich nicht für GC-B bestätigen. Die mRNA-Expression des CNP-Rezeptors verbleibt stabil von Caput nach Cauda, wohingegen die Proteinexpression ansteigt. Eine leichte Zunahme von sGC auf mRNA- und Proteinebene ist ebenfalls von Caput nach Cauda beobachtbar. Allerdings gilt diese Zunahme des sGC-Proteins nur für die Membranfraktion und nicht für die cytosolische Fraktion. Die Vermutung liegt nahe, dass eine Translokation des NO-Rezeptors an die Membran von Caput zum Cauda stattfindet (Hildebrandt, Dissertationsschrift).



Zusätzlich war es möglich, die Rezeptoren GC-A, GC-B und sGC durch die Kombination von LCM und RT-PCR in Verbindung mit spezifischen Markergenen explizit in der Muskelschicht des NH zu lokalisieren. Diese Daten konnten bereits in einer Veröffentlichung von 2014 (Mietens *et al.*, 2014) publiziert werden.

Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, die als Liganden für die zuvor genannten membranständigen Rezeptoren dienen, wurden ebenfalls auf ihre Expression in Caput, Corpus und Cauda untersucht. Die natriuretischen Peptide sind vor allem bekannt durch ihre Beteiligung an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, sowie des Blutdrucks über diuretische, natriuretische und relaxierende Effekte (Arjamaa, 2014; Cho *et al.*, 1999). Transkripte zu Vorstufen des GC-A-bindenden Hormons ANP fehlten vollständig im NH, während interessanterweise Transkripte zu Vorstufen von BNP schwach in der Caput- und Corpus-Region nachzuweisen war. Die Hormone ANP und BNP werden hauptsächlich im Herzen gebildet und über die Blutbahn zum Zielorgan transportiert (Kuwahara *et al.*, 2010), aber auch extrakardiale Expressionsstellen sind bekannt. ANP-mRNA und auch ANP-Immunreaktivität konnten in Zellen des Aortenbogens der Lunge, des Gehirns, der Nieren, des Magen-Darm-Trakts und im Thymus nachgewiesen werden (Kuhn, 2003; Della Penna *et al.*, 2014). BNP-Expression wurde zuerst im Gehirn von Schweinen beschrieben, woraus sich der Name ableitet (Sudoh *et al.*, 1988). Darüber hinaus wurde eine Expression von BNP in der Lunge, der Schilddrüse, der Nebenniere, der Niere, der Milz, der Ovarien, dem Uterus und in der quergestreiften Muskulatur beschrieben (Dziedzic *et al.*, 2014; Gerbes *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 2014). ANP kann mit höherer Affinität an den Rezeptor GC-A binden als BNP. In der Literatur gibt es Hinweise, dass BNP auch lokale und parakrine Effekte im Herzen auslösen könnte. Die Aminosäuresequenzen von ANP und CNP sind konserviert zwischen verschiedenen Tierspezies, wohingegen die Sequenz von BNP sehr verschieden ist zwischen Mensch, Ratte und Maus (Kuhn, 2003).

Das Enzym NEP ist im NH verantwortlich für den Abbau von ANP und CNP, während der Abbau durch BNP spärlich ist (Turner *et al.*, 2001).

In der Literatur war zuvor nichts über eine lokale Expression von BNP im Nebenhoden der Ratte zu finden. Es lassen sich zum derzeitigen Augenblick keine expliziten Aussagen über eine zellspezifische Lokalisation von BNP treffen. Zudem wäre es

möglich, dass BNP in Spermien expremiert wird, da die Spermien in den einzelnen Organabschnitten nicht vor der RNA-Isolierung herausgewaschen wurden, so dass man davon ausgehen kann, dass zusätzlich Spermien-mRNA extrahiert wurde. Die schwache Expression von BNP in Caput und Corpus könnte darauf hinweisen, dass BNP in nicht gereiften Spermien expremiert wird. Im Gegensatz zu BNP konnte ANP-Expression in Spermien von Schwein (Zhang *et al.*, 2006) und Ratte (Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Expression der natriuretischen Peptide im männlichen Genitaltrakt speziesabhängig. Auch die Expression des ANP-, BNP-Rezeptors GC-A wurde in humanen Spermien gezeigt.

Zudem ist bekannt, dass neben cAMP auch cGMP eine Rolle bei der Kapazitation des Spermiums spielt. cGMP kann mit seinem Target-Protein PKGI interagieren, welches wiederum, glaubt man neuesten Studien, durch Phosphorylierung den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über CNG-Kanäle steuert (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2014).

Der vor allem parakrin gebildete, aber auch autokrin wirkende Ligand CNP des GC-B- und Clearance-Rezeptors, konnte ebenfalls in allen drei Teilbereichen des NH nachgewiesen werden. CNP wurde spezifisch in der Epithel- und auch Muskelzellschicht des NH von Mensch und Maus in Studien außerhalb dieser Doktorarbeit lokalisiert (Thong *et al.*, 2014).

## 6 Zusammenfassung

Eine Voraussetzung für den Erhalt der männlichen Fertilität ist die intakte Funktion der peritubulären Myofibroblasten der Samenkanälchen im Hoden und der glatten Muskelzellen des Nebenhoden (NH)-Gangs. Eine mögliche Ursache für die Unfruchtbarkeit beim Mann ist eine pathologische Veränderung der Samenkanälchen mit fibrotisch verdickter Lamina propria (LP), was zu verminderter Produktion bzw. gestörtem Transport von Spermatozoen führt.

Das Signalmolekül zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist zentraler Botenstoff für die Funktion der kontraktilen Zellen und steuert deren Relaxation. Die Wirkung von cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDEs) zeitlich und räumlich begrenzt. In der vorliegenden Arbeit sollten PDEs in Hinblick auf die Kontraktilität der Muskelschicht des Hodens und NH näher untersucht werden.

Im Hoden konnten Isoformen aller 11 bekannten PDE-Familien nachgewiesen werden. Die Etablierung einer neuen Methode auf der Basis der Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM) ermöglichte PDE-Transkripte zelltypspezifisch eindeutig zuzuordnen. Sowohl in normaler als auch fibrotischer LP konnten so die PDE-Isoformen PDE1A, PDE1B, PDE3B, PDE5A, PDE8A, PDE9A und PDE10A lokalisiert werden, während die Transkripte von PDE2A, PDE3A, PDE8B und PDE11A fehlten. Als Besonderheit war die PDE1C-Expression nur in normaler, aber nicht in fibrotischer, LP zu finden. Nach Kultivierung peritubulärer Zellen von fibrotischer LP wurde PDE1C aber wieder exprimiert. PDE5A-mRNA konnte in der LP und in Keimzellen, jedoch nicht in Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. PDE8B-Transkripte zeigten sich nur in Leydig-Zellen. Zusätzlich wurde die LCM für Western Blot-Analysen etabliert. Exemplarisch wurden cGMP-generierende Enzyme und die PDE2A in isolierten Samenkanälchen nachgewiesen.

Bei kultivierten peritubulärer Zellen zeigte sich, dass PDE5A und PDE1A die höchste PDE-Expression in Zellen der normalen LP aufwiesen, gefolgt von PDE1C und PDE8A, während die PDE5A in Zellen der fibrotischen LP vor allen anderen am stärksten exprimiert war. Die Expression der PDE-Isoformen wies nur geringe Unterschiede zwischen einzelnen Passagen auf. In Übereinstimmung damit konnte auch gezeigt werden, dass der myofibroblastische Phänotyp der einzelnen Zellen auf

Transkript- und Proteinebene in Kultur erhalten blieb. Überraschenderweise fand sich auch bei klassischen Muskelzellen von Pulmonalarterie (HPASMCs) und Prostata (HPrSMCs) in Kultur ein solcher Myofibroblasten-Phänotyp.

Im NH-Gang konnten beim Menschen PDE5A-Transkripte in der Muskelschicht, aber nicht im Epithel nachgewiesen werden. PDE3A und PDE3B fehlten beim Menschen, waren aber in der Muskelschicht des Ratten-NH zusammen mit PDE1, PDE2 und PDE5A exprimiert. Regionsabhängige Unterschiede zeigten sich für PDE1 mit einer Abnahme von Caput nach Cauda, während PDE2 im Corpus am höchsten exprimiert war. PDE3A, PDE3B sowie PDE5A waren in allen drei Abschnitten nahezu gleich stark exprimiert. Im Organbad konnte durch Einsatz spezifischer PDE-Inhibitoren die funktionelle Bedeutung dieser PDEs für die Kontraktilität des NH-Ganges gezeigt werden. Daneben konnten auch die zugehörigen cGMP-generierenden Enzyme auf Transkript- und Proteinebene sowie ihre Liganden in den NH-Abschnitten nachgewiesen werden.

Die zelltypspezifische Expression und Funktion von PDE-Isoformen spricht für eine fein regulierte Steuerung des cGMP-Systems der kontraktilen Zellen von Hoden und NH mit Bedeutung für das Verständnis männlicher Infertilität und Arzneimittelnebenwirkungen. Im Gegensatz zu normaler LP fehlt die PDE1C in fibrotisch veränderter LP, wird in isolierten Zellen unter Kulturbedingungen jedoch erneut exprimiert. Dieser Befund deutet auf eine besondere Rolle dieses Enzyms beim Proliferationsgeschehen und bei der Fibroseentwicklung (nicht nur im Hoden) hin.

## 7 Summary

The functional integrity of peritubular myofibroblasts of seminiferous tubules of the testis and smooth muscle cells of the epididymal duct is a prerequisite for male fertility. A pathological disturbance of seminiferous tubules with fibrotic and thickened lamina propria (LP) leads to reduced production and disturbed transport of spermatozoa and coincides with male infertility. The messenger molecule cyclic guanosine monophosphate (cGMP) represents an important mediator of contractile cell function and thereby regulates relaxation. The duration of cGMP action is limited spatially and temporally by phosphodiesterases (PDEs). This study describes the PDE isoforms with regard to contractility of smooth muscle cells of the male reproductive tract.

In the testis, PDEs of the eleven families described so far were detected. By a new approach of Laser-Capture-Microdissection (LCM) cell type-specific PDE expression could be demonstrated. By this procedure PDE1A, PDE1B, PDE3B, PDE5A, PDE8A, PDE9A and PDE10A could be localized to regular and fibrotic LP, but transcripts of PDE2A, PDE3A, PDE8B and PDE11A were shown to be absent. PDE1C expression was found in regular, but not in fibrotic LP. In cultured peritubular cells from fibrotic LP, however, PDE1C expression was again detectable. PDE5A-mRNA could be located in LP and germ cells, but not in Sertoli cells. PDE8B transcripts were found only in Leydig cells. Additionally, LCM was established for Western blot analyses. For example, cGMP-generating enzymes and PDE2A could be detected in isolated seminiferous tubules. In cultured peritubular cells of regular LP PDE5A and PDE1A showed the highest expression of all PDEs, followed by PDE1C and PDE8A. In cultured cells from fibrotic LP PDE5A expression predominated compared to all other PDEs. Culturing only slightly affected PDE expression when comparing different passages of peritubular cells. In agreement, the myofibroblast phenotype of single cells was preserved both at the transcript and protein level under culture condition from passage to passage. Surprisingly, typical smooth muscle cells from human lung artery (HPASMCs) and prostate (HPrSMCs) also showed a myofibroblast phenotype under culture condition.

In the human epididymis, PDE5 transcripts could be detected in the smooth layer of the duct, but not in epithelium. PDE3A and PDE3B transcripts were absent in the human epididymal duct, but could be localized to the smooth muscle layer of the rat epididymal duct together with PDE1, PDE2 and PDE5A. PDE1 expression declined from caput to cauda, whereas PDE2 showed its highest expression in the corpus region. PDE3A, PDE3B and PDE5A were expressed in equal amounts in all parts of the epididymis. Functional relevance of PDEs for contractile cell function was demonstrated in organ bath studies using specific PDE inhibitors. Furthermore, the corresponding cGMP-generating enzymes and their ligands could be detected in the different regions of the epididymal duct both at the transcript and protein level.

The cell type-specific expression and function of PDE isoforms point to a well-orchestrated regulation of cGMP signaling for contractile cell function of the testis and epididymis. This might be important for the understanding of male infertility and side effects of various drugs. Compared to regular LP, PDE1C is absent in fibrotic LP in situ, but is expressed again in isolated cells under culture conditions, indicating a special role of PDE1C for cell proliferation and development of fibrosis, not only in the testis but also in other organs.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

15dPGJ2	15-Deoxyprostaglandin J2
ABP	Androgen-bindendes Protein
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AMH	Anti-Müller-Hormon
AR	Androgen-Rezeptor
ARKO	Androgen-Rezeptor-Knock-out-Mausmodell
ATP	Adenosintriphosphat
BKCa	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte-Kalium-Kanäle
BNP	Brain-type natriuretisches Peptid
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin-gene-related peptide
CNG-Kanäle	„cyclic nucleotide gated“-Kanäle, zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kanäle
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO	Kohlenstoffmonoxid
COOH	Carboxylsäure
COPD	Chronic-obstructive-pulmonary-disease, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAG	Diazylglyzerol
ED	Erektile Dysfunktion
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAF-Domäne	Allosterische cGMP-Bindungsstellen, Vorkommen in cGMP-regulierten PDEs, Adenylatzyklasten und dem bakteriellen Transkriptionsfaktor FlhA
GC-A, GC-B	Guanylylcyclasen Typ A, B
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF-I	Insulinlike-growth-factor-I
IL-6	Interleukin-6
INSL3	Insulin-like factor 3
IP3	Inositol-1.4.5-triphosphat
KO	Knock-out-Mausmodell
LH	Luteinisierendes Hormon
LP	Lamina propria

MA	mixed-atrophy
MCP-1	monocyte-chemoattractant-protein-1
MLC	Myosin-Leichte-Kette
MLCK	Myosin-Leichte-Kette-Kinase
Myh11	Myosinheavy-chain 11
NH	Nebenhoden
NO	Stickstoff
NOA	nichtobstruktiver Azoospermie
NOS	Stickstoff-Synthase
NPR-C	Clearance-Rezeptor
NPY	Neuropeptid Y
PAH	Pulmonary hypertension; Pulmonale Hypertonie
PCR	Polymerase-chain-reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterasen
PDGF	platelet-derived-growth-factor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PmodS	peritubular-cell-factor-that-modulates-sertoli-cell-function
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction
SCO	Sertoli-cell-only-Syndrom
sGC	Soluble guanylate cyclase, lösliche Guanylylzyklase
SMA	Smooth-muscle-actin
SPARC	secreted-protein-acidic-and-rich-in-cysteine
TESE	testikuläre Spermienextraktion
TGFβ	Transforming-growth-factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UCR	upstream-conserved-region
VIP	vasoactive-intestinale-peptid



## 9      **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Schema des Hodens und Nebenhodens	14
<b>Abbildung 2:</b> Querschnitt eines Tubulus seminiferi	16
<b>Abbildung 3:</b> Schema eines Ratten-Nebenhodens	28
<b>Abbildung 4:</b> Schema der Phosphodiesterasen-Domänen	42
<b>Abbildung 5:</b> Schema des cAMP/cGMP-Signalweges	52
<b>Abbildung 6:</b> Nachweis spezifischer PDE-Isoformen in menschlichen Hoden- und Lungenproben	81
<b>Abbildung 7:</b> Überblick über Gewebeareale, welche zur Etablierung einer modifizierten LCM-Methode verwendet wurden	82
<b>Abbildung 8:</b> LCM mit anschließender RT-PCR zum Zelltyp-spezifischen Nachweis der PDE5A im Hoden	84
<b>Abbildung 9:</b> Überblick über die Expression spezifischer PDE-Isoformen in der unverdickten LP und im Keimepithel mit intakter Spermatogenese	86
<b>Abbildung 10:</b> Überblick über die Expression spezifischer PDE-Isoformen in der verdickten LP und im Keimepithel mit gestörter Spermatogenese (SCO-Syndrom)	88
<b>Abbildung 11:</b> Darstellung der PDE-Isoformen, die gleichzeitig in der unverdickten und in der verdickten LP exprimiert sind	89
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der PDE-Isoformen, die weder in der unverdickten noch in der verdickten LP exprimiert sind	90
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich der Expression von PDE1C in unverdickter und verdickter LP	91
<b>Abbildung 14:</b> Expression von PDE8B im menschlichen Hoden	93
<b>Abbildung 15:</b> Lokalisierung von PDE8B im menschlichen Hoden	94
<b>Abbildung 16:</b> Histologische Beurteilung der Lamina propria-Morphologie	95
<b>Abbildung 17:</b> RT-PCR-Untersuchungen von Primärzellen auf Kontamination benachbarter Zellen der Lamina propria	96
<b>Abbildung 18:</b> Genexpressionsdaten von zwei humanen Hodenbiopsien mit unverdickter LP (A) und einer Hodenbiopsie mit verdickter LP	98
<b>Abbildung 19:</b> mRNA-Expression der PDE-Isoformen in unverdickter und verdickter Lamina propria	100

<b>Abbildung 20:</b> mRNA-Expression kontraktile Marker in unverdickter und verdickter Lamina propria	105
<b>Abbildung 21:</b> mRNA-Expression von Bindegewebsmarkern in unverdickter und verdickter Lamina propria	107
<b>Abbildung 22:</b> Expression von PDE1C in kultivierten peritubulären Zellen der verdickten LP	109
<b>Abbildung 23:</b> Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen der unverdickten LP (B. 1)	112
<b>Abbildung 24:</b> Quantitative Auswertung der Ki67-postiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der unverdickten LP (Biopsie 1)	114
<b>Abbildung 25:</b> Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen der unverdickten LP (B. 2)	116
<b>Abbildung 26:</b> Quantitative Auswertung der Ki67-postiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der unverdickten LP (Biopsie 2)	118
<b>Abbildung 27:</b> Nachweis von Muskelzell- und Bindegewebsmarkern in isolierten peritubulären Zellen von Biopsie 3 (verdickte LP)	120
<b>Abbildung 28:</b> Quantitative Auswertung der Ki67-postiven Zellen und der Kolokalisation von CD90 und Calponin in kultivierten Zellen der verdickten LP (Biopsie 3)	122
<b>Abbildung 29:</b> Vergleich von klassischen Muskelzellen mit peritubulären Zellen	124
<b>Abbildung 30:</b> mRNA-Expression kontraktile Marker in HPASMCs und HPrSMCs	125
<b>Abbildung 31:</b> mRNA-Expression von Bindegewebsmarkern in HPASMCs und HPrSMCs	127
<b>Abbildung 32:</b> GC-A Nachweis an einem ganzen Hodenschnitt der Ratte	129
<b>Abbildung 33:</b> GC-A Nachweis in isolierten Arealen (Tubuli und Interstitium) mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion	130
<b>Abbildung 34:</b> Nachweis von PDE2A in isolierten ganzen Tubuli seminiferi des Menschen	132
<b>Abbildung 35:</b> Nachweis der sGC $\beta_1$ -Untereinheit in isolierten Tubuli seminiferi des Menschen	133
<b>Abbildung 36:</b> Untersuchung einiger Transkripte des cGMP-Signalweges in definierten Regionen des Ratten-Nebenhodens	135

<b>Abbildung 37:</b> Nachweis von Transkripten cGMP-bildender Rezeptoren in der Laser-mikrodissezierten Muskelzellschicht der Ratte	135
<b>Abbildung 38:</b> Box-Plot Darstellung der relativen Expression spezifischer PDE-Isoformen in definierten Abschnitten des Nebenhodens	136
<b>Abbildung 39:</b> Box-Plot Darstellung des quantitativen Verhältnisses spezifischer PDE-Isoformen in einzelnen Nebenhodenabschnitten	137
<b>Abbildung 40:</b> Nachweis spezifischer PDEs in der Laser-mikrodissezierten Muskelzellschicht des Caudaabschnittes des Rattennebenhodens	139
<b>Abbildung 41:</b> Lokalisierung spezifischer PDEs im humanen Nebenhoden	140
<b>Abbildung 42:</b> Vergleich der Expression und Lokalisierung spezifischer PDEs im Nebenhoden von Mensch und Ratte	142
<b>Abbildung 43:</b> Relaxierende Effekte verschiedener Stimuli im Organbad	144
<b>Abbildung 44:</b> Inhibitorische Wirkung ansteigender Konzentrationen des selektiven PDE2-Inhibitors BAY60-7550	146
<b>Abbildung 45:</b> Inhibitorische Wirkung ansteigender Konzentrationen des selektiven PDE3-Inhibitors Trequinsin	147
<b>Abbildung 46:</b> Einfluss des PDE1-Inhibitors Dioclein auf die Spontanaktivität von Nebenhodengang-Segmenten der Ratte	148



## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Affinität der PDE-Isoformen gegenüber cAMP und cGMP und Angabe spezifischer PDE-Inhibitoren	43
<b>Tabelle 2:</b>	Pipettierschema zur cDNA Synthese der isolierten RNA aus gepickten Proben	62
<b>Tabelle 3:</b>	Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Geweben und kultivierten humanen peritubulären Myofibroblasten-Zellen	62
<b>Tabelle 4:</b>	Menschspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide	63
<b>Tabelle 5:</b>	Rattenspezifische Sequenzen intronspannender Oligonukleotide	64
<b>Tabelle 6:</b>	Pipettierschema für PCR-Reaktionen von mRNA ganzer Gewebeproben	66
<b>Tabelle 7:</b>	Pipettierschema für gepickte Proben	66
<b>Tabelle 8:</b>	Menschspezifische Primersequenzen für die quantitative Real-Time-PCR	69
<b>Tabelle 9:</b>	Pipettierschema für die qPCR-Versuche von Transkripten aus Myofibroblasten-Primärzellen humaner Hodentubuli	70
<b>Tabelle 10:</b>	Verwendete Puffersysteme	77
<b>Tabelle 11:</b>	Stripping-Protokoll	79
<b>Tabelle 12:</b>	Konzentrationen und IC <sub>50</sub> -Werte der verwendeten PDE-Inhibitoren	80



## 11 Literatur

- Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, Welsch U, Kohn FM, Ullrich Schwarzer J, *et al.* (2012). High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function. *Int J Androl* **35**(4): 550-561.
- Adams ML, Meyer ER, Sewing BN, Cicero TJ (1994). Effects of nitric oxide-related agents on rat testicular function. *J Pharmacol Exp Ther* **269**(1): 230-237.
- Ahmad F, Murata T, Shimizu K, Degerman E, Maurice D, Manganiello V (2014). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Dis.*
- Aksglaede L, Juul A (2013). Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol* **168**(4): R67-76.
- Albersen M, Linsen L, Tinel H, Sandner P, Van Renterghem K (2013). Synergistic effects of BAY 60-4552 and vardenafil on relaxation of corpus cavernosum tissue of patients with erectile dysfunction and clinical phosphodiesterase type 5 inhibitor failure. *J Sex Med* **10**(5): 1268-1277.
- Albert S, Wistuba J, Eildermann K, Ehmecke J, Schlatt S, Gromoll J, *et al.* (2012). Comparative marker analysis after isolation and culture of testicular cells from the immature marmoset. *Cells Tissues Organs* **196**(6): 543-554.
- Albrecht M (2009). Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat* **191**(6): 532-540.
- Albrecht M, Frungieri MB, Gonzalez-Calvar S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A (2005a). Evidence for a histaminergic system in the human testis. *Fertil Steril* **83**(4): 1060-1063.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Ramsch R, Meineke V, Kohn FM, *et al.* (2005b). Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci* **62**(23): 2867-2876.
- Albrecht M, Ramsch R, Kohn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A (2006). Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* **91**(5): 1956-1960.
- Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS (2007). Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(5): E1399-1408.
- Apa DD, Cayan S, Polat A, Akbay E (2002). Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl* **48**(5): 337-344.
- Arenas MI, Bethencourt FR, De Miguel MP, Fraile B, Romo E, Paniagua R (1997). Immunocytochemical and quantitative study of actin, desmin and vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men. *J Reprod Fertil* **110**(1): 183-193.
- Arjamaa O (2014). Physiology of natriuretic peptides: The volume overload hypothesis revisited. *World J Cardiol* **6**(1): 4-7.
- Baillie GS (2009). Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J* **276**(7): 1790-1799.
- Bajpai VK, Mistriotis P, Loh YH, Daley GQ, Andreadis ST (2012). Functional vascular smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells via mesenchymal stem cell intermediates. *Cardiovasc Res* **96**(3): 391-400.

- Baker MA, Lewis B, Hetherington L, Aitken RJ (2003). Development of the signalling pathways associated with sperm capacitation during epididymal maturation. *Mol Reprod Dev* **64**(4): 446-457.
- Ball HJ, Hunt NH (2004). Needle in a haystack: microdissecting the proteome of a tissue. *Amino Acids* **27**(1): 1-7.
- Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, Stanley A, Pappin D, Naven T, *et al.* (1999). The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings. *Electrophoresis* **20**(4-5): 689-700.
- Barnett CF, Machado RF (2006). Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* **2**(4): 411-422.
- Bartel J, Feuerstacke C, Galuska CE, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Geyer R, *et al.* (2014). Laser microdissection of paraffin embedded tissue as a tool to estimate the sialylation status of selected cell populations. *Anal Chem* **86**(5): 2326-2331.
- Bazhin AV, Tambor V, Dikov B, Philippov PP, Schadendorf D, Eichmuller SB (2010). cGMP-phosphodiesterase 6, transducin and Wnt5a/Frizzled-2-signaling control cGMP and Ca(2+) homeostasis in melanoma cells. *Cell Mol Life Sci* **67**(5): 817-828.
- Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE (2010). Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **16**(5): 467-491.
- Beca S, Ahmad F, Shen W, Liu J, Makary S, Polidovitch N, *et al.* (2013). Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circ Res* **112**(2): 289-297.
- Begum N, Shen W, Manganiello V (2011). Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: implications in cardiovascular diseases and infertility. *Curr Opin Pharmacol* **11**(6): 725-729.
- Bender AT, Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.
- Bender AT, Ostenson CL, Wang EH, Beavo JA (2005). Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 497-502.
- Bergh A, Damber JE (1992). Immunohistochemical demonstration of androgen receptors on testicular blood vessels. *Int J Androl* **15**(5): 425-434.
- Bilodeau-Goeseels S (2003). Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology* **60**(9): 1679-1690.
- Bock P, Breitenacker G, Lunglmayr G (1972). [Contractile fibroblasts (myofibroblasts) in the lamina propria of human seminiferous tubules]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **133**(4): 519-527.
- Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, *et al.* (1993). A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol* **13**(10): 6558-6571.
- Boo S, Dagnino L (2013). Integrins as Modulators of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dermal Fibroblasts During Skin Regeneration After Injury. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**(5): 238-246.
- Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, van Wiechen MP, Steendijk P, de Vroomen M, *et al.* (2014). Sildenafil treatment in established right ventricular dysfunction



- improves diastolic function and attenuates interstitial fibrosis independent from afterload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **307**(3): H361-369.
- Bornfeldt KE (1996). Intracellular Signaling in Arterial Smooth Muscle Migration versus Proliferation. *Trends Cardiovasc Med* **6**(5): 143-151.
- Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* **347**(6294): 677-680.
- Brehm R, Rey R, Kliesch S, Steger K, Marks A, Bergmann M (2006). Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anat Embryol (Berl)* **211**(3): 223-236.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* **135**(3): 1227-1234.
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahling M, *et al.* (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J* **31**(7): 1654-1665.
- Brown DM, Hutchison L, Donaldson K, MacKenzie SJ, Dick CA, Stone V (2007). The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: the role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicol Lett* **168**(1): 1-6.
- Bruning G, Dierichs R, Stumpel C, Bergmann M (1993). Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia* **25**(6): 311-316.
- Burnett AL, Saito S, Maguire MP, Yamaguchi H, Chang TS, Hanley DF (1995). Localization of nitric oxide synthase in spinal nuclei innervating pelvic ganglia. *J Urol* **153**(1): 212-217.
- Butler T, Paul J, Europe-Finner N, Smith R, Chan EC (2013). Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**(6): C485-504.
- Cai Y, Miller CL, Nagel DJ, Jeon KI, Lim S, Gao P, *et al.* (2011). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 regulates lysosome-dependent type I collagen protein degradation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(3): 616-623.
- Carls A, Winter J, Enderle Y, Burhenne J, Gorenflo M, Haefeli WE (2014). Substantially increased sildenafil bioavailability after sublingual administration in children with congenital heart disease: two case reports. *J Med Case Rep* **8**: 171.
- Carvalho TL, Hodson NP, Blank MA, Watson PF, Mulderry PK, Bishop AE, *et al.* (1986). Occurrence, distribution and origin of peptide-containing nerves of guinea-pig and rat male genitalia and the effects of denervation on sperm characteristics. *J Anat* **149**: 121-141.
- Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* **113**(18): 2221-2228.
- Challa AA, Stefanovic B (2011). A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Mol Cell Biol* **31**(18): 3773-3789.
- Challa AA, Vukmirovic M, Blackmon J, Stefanovic B (2012). Withaferin-A reduces type I collagen expression in vitro and inhibits development of myocardial fibrosis in vivo. *PLoS One* **7**(8): e42989.

- Chan S, Yan C (2011). PDE1 isozymes, key regulators of pathological vascular remodeling. *Curr Opin Pharmacol* **11**(6): 720-724.
- Chen B, Calvert AE, Meng X, Nelin LD (2012). Pharmacologic agents elevating cAMP prevent arginase II expression and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(2): 218-226.
- Chevendra V, Weaver LC (1992). Distributions of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in populations of postganglionic neurons innervating the rat kidney, spleen and intestine. *Neuroscience* **50**(3): 727-743.
- Cho Y, Somer BG, Amatya A (1999). Natriuretic peptides and their therapeutic potential. *Heart Dis* **1**(5): 305-328.
- Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C (2012). Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med* **58**(4): 179-190.
- Chung H, Jung SH, Ryu JK, Kim B, Kim HS, Yang SK (2012). Isolation and characterization of smooth muscle cells from rat corpus cavernosum tissue for the study of erectile dysfunction. *Korean J Urol* **53**(8): 556-563.
- Cichero E, D'Ursi P, Moscatelli M, Bruno O, Orro A, Rotolo C, *et al.* (2013). Homology modeling, docking studies and molecular dynamic simulations using graphical processing unit architecture to probe the type-11 phosphodiesterase catalytic site: a computational approach for the rational design of selective inhibitors. *Chem Biol Drug Des* **82**(6): 718-731.
- Cigorrage SB, Chemes H, Pellizzari E (1994). Steroidogenic and morphogenic characteristics of human peritubular cells in culture. *Biol Reprod* **51**(6): 1193-1205.
- Cisneros-Mejorado A, Hernandez-Soberanis L, Islas-Carbajal MC, Sanchez D (2014). Capacitation and Ca(2+) influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology* **2**(1): 145-154.
- Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* **52**(1): 198-236.
- Colson BA, Gruber SJ, Thomas DD (2012). Structural dynamics of muscle protein phosphorylation. *J Muscle Res Cell Motil* **33**(6): 419-429.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* **356**(1-2): 65-73.
- Cook SJ, McCormick F (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**(5136): 1069-1072.
- Cornwall GA (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* **15**(2): 213-227.
- Corti R, Burnett JC, Jr., Rouleau JL, Ruschitzka F, Luscher TF (2001). Vasoepitidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* **104**(15): 1856-1862.
- Cosentino MJ, Cockett AT (1986). Structure and function of the epididymis. *Urol Res* **14**(5): 229-240.
- Counis R, Laverriere JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, *et al.* (2005). Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev* **45**(3): 243-254.
- Cygnar KD, Zhao H (2009). Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. *Nat Neurosci* **12**(4): 454-462.
- Darby IA, Hewitson TD (2007). Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* **257**: 143-179.

- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K (1990). Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* **262**(2): 253-261.
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, deVente J, Koesling D, Holstein AF (1997). Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell Tissue Res* **287**(1): 161-170.
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF (1995). Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol* **58**(1): 17-30.
- de Godoy MA, Rattan S (2011). Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci* **32**(7): 384-393.
- de Jonge HJ FR, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A. (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* **2**(9): 898.
- De Miguel MP, Marino JM, Gonzalez-Peramato P, Nistal M, Regadera J (2001). Epididymal growth and differentiation are altered in human cryptorchidism. *J Androl* **22**(2): 212-225.
- Della Penna SL, Cao G, Carranza A, Zotta E, Gorzalczy S, Cerrudo CS, *et al.* (2014). Renal overexpression of atrial natriuretic peptide and hypoxia inducible factor-1alpha as adaptive response to a high salt diet. *Biomed Res Int* **2014**: 936978.
- Dempsey OJ, Kerr KM, Gomersall L, Remmen H, Currie GP (2006). Idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *QJM* **99**(10): 643-654.
- Deninno MP, Andrews M, Bell AS, Chen Y, Eller-Zarbo C, Eshelby N, *et al.* (2009). The discovery of potent, selective, and orally bioavailable PDE9 inhibitors as potential hypoglycemic agents. *Bioorg Med Chem Lett* **19**(9): 2537-2541.
- di Gioia CR, van de Greef WM, Sperti G, Castoldi G, Todaro N, Ierardi C, *et al.* (2000). Angiotensin II increases calponin expression in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(3): 965-969.
- Dobashi M, Fujisawa M, Naito I, Yamazaki T, Okada H, Kamidono S (2003). Distribution of type IV collagen subtypes in human testes and their association with spermatogenesis. *Fertil Steril* **80 Suppl 2**: 755-760.
- Dolci S, Belmonte A, Santone R, Giorgi M, Pellegrini M, Carosa E, *et al.* (2006). Subcellular localization and regulation of type-1C and type-5 phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* **341**(3): 837-846.
- Dyson MT, Kowalewski MP, Manna PR, Stocco DM (2009). The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol* **300**(1-2): 94-103.
- Dziedzic M, Petkowicz B, Bednarek-Skublewska A, Solski J, Buczaj A, Choina P (2014). Relationship between reninase and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT pro-BNP) in haemodialysis patients. *Ann Agric Environ Med* **21**(1): 132-135.
- Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T (1996). Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* **315 ( Pt 2)**: 549-554.
- Ecroyd H, Asquith KL, Jones RC, Aitken RJ (2004). The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Dev Biol* **268**(1): 53-63.
- Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP (1994). Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol Res* **22**(5): 287-290.
- El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S, Le Magueresse-Battistoni B (2005). Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial

- interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* **187**(1): 135-147.
- Eliasson R, Risley PL (1968). Adrenergic innervation of the male reproductive ducts of some mammals. 3. Distributions of noradrenaline and adrenaline. *Acta Physiol Scand* **73**(3): 311-319.
- Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, *et al.* (2006). Laser-capture microdissection. *Nat Protoc* **1**(2): 586-603.
- Essayan DM (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol* **108**(5): 671-680.
- Fadic R, Mezzano V, Alvarez K, Cabrera D, Holmgren J, Brandan E (2006). Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *J Cell Mol Med* **10**(3): 758-769.
- Fan Chung K (2006). Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol* **533**(1-3): 110-117.
- Fecher-Trost C, Wissenbach U, Beck A, Schalkowsky P, Stoerger C, Doerr J, *et al.* (2013). The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG. *J Biol Chem* **288**(23): 16629-16644.
- Ferdous Z, Peterson SB, Tseng H, Anderson DK, Iozzo RV, Grande-Allen KJ (2010). A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts. *J Biomed Mater Res A* **93**(2): 419-428.
- Fibbi B, Morelli A, Vignozzi L, Filippi S, Chavalmane A, De Vita G, *et al.* (2010). Characterization of phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in the human male lower urinary tract. *J Sex Med* **7**(1 Pt 1): 59-69.
- Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Vannelli GB, Marini M, Ferruzzi P, *et al.* (2005). Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. *Endocrinology* **146**(8): 3506-3517.
- Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, *et al.* (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* **99**(8): 816-828.
- Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB (1998). Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3): 570-577.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, *et al.* (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**(6 Pt 2): 1121-1131.
- Franchimont P, Chari S, Demoulin A (1975). Hypothalamus-pituitary-testis interaction. *J Reprod Fertil* **44**(2): 335-350.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* **62**(3): 525-563.
- Francis SH, Corbin JD (2005). Phosphodiesterase-5 inhibition: the molecular biology of erectile function and dysfunction. *Urol Clin North Am* **32**(4): 419-429, vi.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreassen D, Hansen PB, Skott O (2002). Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res* **90**(9): 996-1003.
- Fritsch RM, Saur D, Kurjak M, Oesterle D, Schlossmann J, Geiselhoring A, *et al.* (2004). InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-

- induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem* **279**(13): 12551-12559.
- Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Kohn FM, Vogt HJ, *et al.* (2002). Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril* **78**(2): 298-306.
- Fuchs E, Weber K (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**: 345-382.
- Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, *et al.* (2010). Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology* **151**(9): 4381-4388.
- Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, *et al.* (1999). Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* **274**(26): 18438-18445.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* **274**(16): 10927-10935.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**(5789): 373-376.
- Gambichler T, Kreuter A, Skrygan M, Burkert B, Altmeyer P, Schieren G (2009). Decorin is significantly overexpressed in nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Clin Pathol* **132**(1): 139-143.
- Ganem JP, Jhaveri FM, Marroum MC (1998). Primary adenocarcinoma of the epididymis: case report and review of the literature. *Urology* **52**(5): 904-908.
- Gerbes AL, Dagnino L, Nguyen T, Nemer M (1994). Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **78**(6): 1307-1311.
- Ghofrani HA, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, *et al.* (2003). Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **167**(8): 1139-1141.
- Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N, *et al.* (2002a). Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* **136**(7): 515-522.
- Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, *et al.* (2002b). Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* **360**(9337): 895-900.
- Giachini FR, Lima VV, Carneiro FS, Tostes RC, Webb RC (2011). Decreased cGMP level contributes to increased contraction in arteries from hypertensive rats: role of phosphodiesterase 1. *Hypertension* **57**(3): 655-663.
- Giese KP, Mizuno K (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* **20**(10): 540-552.
- Giorgi M, Melchiorri G, Nuccetelli V, D'Angelo V, Martorana A, Sorge R, *et al.* (2011). PDE10A and PDE10A-dependent cAMP catabolism are dysregulated oppositely in striatum and nucleus accumbens after lesion of midbrain dopamine neurons in rat: a key step in parkinsonism pathophysiology. *Neurobiol Dis* **43**(1): 293-303.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* **18**(4): 541-609.

- Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC, *et al.* (1998). L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J* **12**(7): 593-601.
- Goncalves RL, Lugnier C, Keravis T, Lopes MJ, Fantini FA, Schmitt M, *et al.* (2009). The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. *Eur J Pharmacol* **620**(1-3): 78-83.
- Gottschalk S, Bygebjerg-Hove I, Bonde M, Nielsen PK, Nguyen TH, Gravesen A, *et al.* (2008). The two-component system CesRK controls the transcriptional induction of cell envelope-related genes in *Listeria monocytogenes* in response to cell wall-acting antibiotics. *J Bacteriol* **190**(13): 4772-4776.
- Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, *et al.* (1993). Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10300-10304.
- Gresser U, Gleiter CH (2002). Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil--review of the literature. *Eur J Med Res* **7**(10): 435-446.
- Griswold MD (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **9**(4): 411-416.
- Guazzi M, Samaja M (2007). The role of PDE5-inhibitors in cardiopulmonary disorders: from basic evidence to clinical development. *Curr Med Chem* **14**(20): 2181-2191.
- Guichaoua MR, Perrin J, Metzler-Guillemain C, Saias-Magnan J, Giorgi R, Grillo JM (2005). Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod* **20**(7): 1897-1902.
- Gulkesen KH, Erdogru T, Sargin CF, Karpuzoglu G (2002). Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian J Androl* **4**(1): 55-60.
- Guo W, Qu F, Xia L, Guo Q, Ying X, Ding Z (2007). Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit. *Reproduction* **133**(3): 575-584.
- Hadley MA, Dym M (1987). Immunocytochemistry of extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: electron microscopic localization. *Biol Reprod* **37**(5): 1283-1289.
- Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, *et al.* (2005). Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* **167**(2): 365-379.
- Haider SG, Talati J, Servos G (1999). Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue Cell* **31**(1): 90-98.
- Hall SK, Armstrong DL (2000). Conditional and unconditional inhibition of calcium-activated potassium channels by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* **275**(6): 3749-3754.
- Hansen G, Jin S, Umetsu DT, Conti M (2000). Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6751-6756.
- Hansen RT, 3rd, Conti M, Zhang HT (2014). Mice deficient in phosphodiesterase-4A display anxiogenic-like behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **231**(15): 2941-2954.
- Harndahl L, Wierup N, Enerback S, Mulder H, Manganiello VC, Sundler F, *et al.* (2004). Beta-cell-targeted overexpression of phosphodiesterase 3B in mice causes impaired

- insulin secretion, glucose intolerance, and deranged islet morphology. *J Biol Chem* **279**(15): 15214-15222.
- Harris GC, Nicholson HD (1998). Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *J Endocrinol* **157**(2): 251-257.
- Hayashi M, Shimada Y, Nishimura Y, Hama T, Tanaka T (2002). Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene. *Biochem Biophys Res Commun* **297**(5): 1253-1258.
- Hedger MP (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* **32**(6): 625-640.
- Heiniger BM, Stoffel MH, Friess AE (1996). Ultrastructural validation of an improved culture system for boar efferent duct epithelium. *J Reprod Fertil* **106**(2): 251-258.
- Hemnes AR, Champion HC (2006). Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **4**(3): 293-300.
- Hermann BP, Heckert LL (2007). Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* **260-262**: 100-108.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech* **73**(4): 241-278.
- Heuser A, Mecklenburg L, Ockert D, Kohler M, Kemkowski J (2013). Selective inhibition of PDE4 in Wistar rats can lead to dilatation in testis, efferent ducts, and epididymis and subsequent formation of sperm granulomas. *Toxicol Pathol* **41**(4): 615-627.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, *et al.* (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* **18**(11): 1178-1184.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113** ( Pt 10): 1671-1676.
- Holstein AF, Eckmann C (1986). Megalospermatocytes: indicators of disturbed meiosis in man. *Andrologia* **18**(6): 601-609.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* **59**(2): 109-125.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 107.
- Hotaling JM, Patel Z (2014). Male endocrine dysfunction. *Urol Clin North Am* **41**(1): 39-53.
- Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS (1996). Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *Biotechniques* **20**(6): 1012-1014, 1016, 1018-1020.
- Huang F, Rock JR, Harfe BD, Cheng T, Huang X, Jan YN, *et al.* (2009). Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21413-21418.
- Huhtaniemi I, Toppari J (1995). Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. *Adv Exp Med Biol* **377**: 33-54.

- Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, Said TM, Mustafa MG, Nada E, *et al.* (2005). Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* **83**(5): 1447-1453.
- Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, *et al.* (2012). Inhibition of phosphodiesterase type 3 dilates the rat ductus arteriosus without inducing intimal thickening. *Circ J* **76**(10): 2456-2464.
- Iffland A, Kohls D, Low S, Luan J, Zhang Y, Kothe M, *et al.* (2005). Structural determinants for inhibitor specificity and selectivity in PDE2A using the wheat germ in vitro translation system. *Biochemistry* **44**(23): 8312-8325.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9265-9269.
- Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Otunctemur A, Cekmen M, Somay A (2009). Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* **92**(3): 1124-1132.
- Ismail S, Sturrock A, Wu P, Cahill B, Norman K, Huecksteadt T, *et al.* (2009). NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- $\beta$ 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**(3): L489-499.
- Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A (2006). Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev* **52**(2): 203-209.
- Jeon YH, Heo YS, Kim CM, Hyun YL, Lee TG, Ro S, *et al.* (2005). Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci* **62**(11): 1198-1220.
- Jiang LY, Shan JJ, Tong XM, Zhu HY, Yang LY, Zheng Q, *et al.* (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is correlated closely with sperm progressive motility and normal morphology in healthy and fertile men with normal sperm parameters. *Andrologia*.
- Jin JM, Yang WX (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene* **551**(1): 15-25.
- Jin SL, Conti M (2002). Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF- $\alpha$  responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7628-7633.
- Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ, Conti M (1999). Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11998-12003.
- Johannisson R, Schulze W, Holstein AF (2003). Megalospermatocytes in the human testis exhibit asynapsis of chromosomes. *Andrologia* **35**(3): 146-151.
- Johnson L, McKenzie KS, Snell JR (1996). Partial wave in human seminiferous tubules appears to be a random occurrence. *Tissue Cell* **28**(2): 127-136.
- Jones MA, Young RH, Scully RE (1997). Adenocarcinoma of the epididymis: a report of four cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* **21**(12): 1474-1480.
- Josso N, di Clemente N, Gouedard L (2001). Anti-Mullerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* **179**(1-2): 25-32.



- Kaleczyc J, Majewski M, Calka J, Lakomy M (1993). Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. *Folia Histochem Cytobiol* **31**(3): 117-123.
- Kanda N, Watanabe S (2001). Regulatory roles of adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterases 1 and 4 in interleukin-13 production by activated human T cells. *Biochem Pharmacol* **62**(4): 495-507.
- Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**(3): 487-496.
- Kaur G, Thompson LA, Dufour JM (2014). Sertoli cells - Immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **30C**: 36-44.
- Kelly MP, Logue SF, Brennan J, Day JP, Lakkaraju S, Jiang L, *et al.* (2010). Phosphodiesterase 11A in brain is enriched in ventral hippocampus and deletion causes psychiatric disease-related phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(18): 8457-8462.
- Keravis T, Lugnier C (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* **165**(5): 1288-1305.
- Keravis T, Lugnier C (2010). Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) and peptide motifs. *Curr Pharm Des* **16**(9): 1114-1125.
- Khan S, Ali RH, Abbasi S, Nawaz M, Muhammad N, Ahmad W (2012). Novel mutations in natriuretic peptide receptor-2 gene underlie acromesomelic dysplasia, type maroteaux. *BMC Med Genet* **13**: 44.
- Kim SZ, Kang SY, Lee SJ, Cho KW (2000). Localization of receptors for natriuretic peptide and endothelin in the duct of the epididymis of the freshwater turtle. *Gen Comp Endocrinol* **118**(1): 26-38.
- Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* **41**(5): 671-678.
- Klaiber M, Kruse M, Volker K, Schroter J, Feil R, Freichel M, *et al.* (2010). Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol* **105**(5): 583-595.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS (2008). Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* **44**(2): 65-81.
- Koesling D, Bohme E, Schultz G (1991). Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J* **5**(13): 2785-2791.
- Kohn FM, Schuppe HC, Jung A, Schulze W (2005). [Andrological relevance of testicular biopsies]. *J Dtsch Dermatol Ges* **3**(7): 532-557; quiz 557-538.
- Koslov DS, Andersson KE (2013). Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens-an update. *Front Pharmacol* **4**: 101.
- Kotlo KU, Rasenick MM, Danziger RS (2010). Evidence for cross-talk between atrial natriuretic peptide and nitric oxide receptors. *Mol Cell Biochem* **338**(1-2): 183-189.
- Krupsky M, Kuang PP, Goldstein RH (1997). Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts. *J Biol Chem* **272**(21): 13864-13868.
- Kuhn M (2003). Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* **93**(8): 700-709.

- Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hastbacka J, Holmberg C, *et al.* (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction* **133**(4): 775-784.
- Kuwahara K, Nakao K (2010). Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J* **57**(7): 555-565.
- L FA (1895). Zoological Notes. *Science* **2**(28): 41-43.
- Lacchini R, Muniz JJ, Nobre YT, Cologna AJ, Martins AC, Tanus-Santos JE (2014). nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. *Pharmacogenomics* **15**(6): 775-784.
- Lakics V, Karran EH, Boess FG (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* **59**(6): 367-374.
- Laughlin AM, Welsh TH, Jr., Love CC, Varner DD, Parrish AR, Forrest DW, *et al.* (2010). In vitro culture of precision-cut testicular tissue as a novel tool for the study of responses to LH. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**(1): 45-53.
- Leask A (2013). Focal Adhesion Kinase: A Key Mediator of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Fibroblasts. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**(5): 247-249.
- Lee KJ, Berkelhamer SK, Kim GA, Taylor JM, O'Shea KM, Steinhorn RH, *et al.* (2014). Disrupted pulmonary artery cyclic guanosine monophosphate signaling in mice with hyperoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**(2): 369-378.
- Lee NP, Cheng CY (2008). Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* **636**: 172-185.
- Lefievre L, de Lamirande E, Gagnon C (2002). Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol Reprod* **67**(2): 423-430.
- Leung PS, Chan HC, Chung YW, Wong TP, Wong PY (1998). The role of local angiotensins and prostaglandins in the control of anion secretion by the rat epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **53**: 15-22.
- Leung PS, Chan HC, Fu LX, Zhou WL, Wong PY (1997). Angiotensin II receptors, AT1 and AT2 in the rat epididymis. Immunocytochemical and electrophysiological studies. *Biochim Biophys Acta* **1357**(1): 65-72.
- Leung PS, Sernia C (2003). The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol* **30**(3): 263-270.
- Leung PS, Wong TP, Lam SY, Chan HC, Wong PY (2000). Testicular hormonal regulation of the renin-angiotensin system in the rat epididymis. *Life Sci* **66**(14): 1317-1324.
- Levallet G, Levallet J, Bouraima-Lelong H, Bonnamy PJ (2007). Expression of the cAMP-phosphodiesterase PDE4D isoforms and age-related changes in follicle-stimulating hormone-stimulated PDE4 activities in immature rat sertoli cells. *Biol Reprod* **76**(5): 794-803.
- Lin CS, Xin Z, Namiki M, Albersen M, Muller D, Lue TF (2013). Direct androgen regulation of PDE5 gene or the lack thereof. *Int J Impot Res* **25**(3): 81-85.
- Lindquist JN, Marzluff WF, Stefanovic B (2000). Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(3): G471-476.
- Liu X, Nie S, Huang D, Xie M (2014). Effects of nonylphenol exposure on expression of cell receptors and secretory function in mouse Sertoli TM4 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* **37**(2): 608-616.

- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**(8): 307-312.
- Loughney K, Taylor J, Florio VA (2005). 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int J Impot Res* **17**(4): 320-325.
- Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, *et al.* (1989). Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J* **8**(5): 1377-1384.
- Lu Z, Xu X, Hu X, Lee S, Traverse JH, Zhu G, *et al.* (2010). Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation* **121**(13): 1474-1483.
- Lubahn DB, Tan JA, Quarmby VE, Sar M, Joseph DR, French FS, *et al.* (1989). Structural analysis of the human and rat androgen receptors and expression in male reproductive tract tissues. *Ann N Y Acad Sci* **564**: 48-56.
- Luetjens CM, Weinbauer GF, Wistuba J (2005). Primate spermatogenesis: new insights into comparative testicular organisation, spermatogenic efficiency and endocrine control. *Biol Rev Camb Philos Soc* **80**(3): 475-488.
- Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC (1986). Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* **35**(10): 1743-1751.
- Lugnier C, Muller B, Le Bec A, Beaudry C, Rousseau E (1993). Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther* **265**(3): 1142-1151.
- Lugnier C (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* **109**(3): 366-398.
- Lugnier C (2011). PDE inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome? *Curr Opin Pharmacol* **11**(6): 698-706.
- Luong C, Rey-Perra J, Vadivel A, Gilmour G, Sauve Y, Koonen D, *et al.* (2011). Antenatal sildenafil treatment attenuates pulmonary hypertension in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Circulation* **123**(19): 2120-2131.
- Mackay S (2000). Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol* **200**: 47-99.
- Mackay S, Smith RA (2007). Effects of growth factors on testicular morphogenesis. *Int Rev Cytol* **260**: 113-173.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* **59**(1): 1-13.
- Mancini ML, Sonis ST (2014). Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities. *Front Pharmacol* **5**: 51.
- Martin R, Santamaria L, Nistal M, Fraile B, Paniagua R (1992). The peritubular myofibroblasts in the testes from normal men and men with Klinefelter's syndrome. A quantitative, ultrastructural, and immunohistochemical study. *J Pathol* **168**(1): 59-66.
- Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, *et al.* (2004). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest* **114**(2): 196-205.
- Maurice DH (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci* **10**: 1221-1228.

- Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* **13**(4): 290-314.
- Mechlin CW, Levesque J, Feustel P, Kogan BA (2014). Mast cell numbers negatively correlate with fibrosis in cryptorchid testes. *J Pediatr Urol* **10**(3): 527-531.
- Mehats C, Jin SL, Wahlstrom J, Law E, Umetsu DT, Conti M (2003). PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. *FASEB J* **17**(13): 1831-1841.
- Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R (2006a). Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology* **147**(4): 2051-2062.
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R (2006b). Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod* **75**(4): 651-659.
- Mewe M, Wulfsen I, Middendorff R, Bauer CK (2007). Differential modulation of bovine epididymal activity by oxytocin and noradrenaline. *Reproduction* **134**(3): 493-501.
- Michibata H, Yanaka N, Kanoh Y, Okumura K, Omori K (2001). Human Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1A: novel splice variants, their specific expression, genomic organization, and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* **1517**(2): 278-287.
- Middendorff R, Davidoff MS, Behrends S, Mewe M, Miethens A, Muller D (2000a). Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. *Andrologia* **32**(1): 55-59.
- Middendorff R, Kumm M, Davidoff MS, Holstein AF, Muller D (2000b). Generation of cyclic guanosine monophosphate by heme oxygenases in the human testis--a regulatory role for carbon monoxide in Sertoli cells? *Biol Reprod* **63**(2): 651-657.
- Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS (2002). The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(7): 3486-3499.
- Middendorff R, Muller D, Paust HJ, Davidoff MS, Mukhopadhyay AK (1996). Natriuretic peptides in the human testis: evidence for a potential role of C-type natriuretic peptide in Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab* **81**(12): 4324-4328.
- Middendorff R, Muller D, Paust HJ, Holstein AF, Davidoff MS (1997a). New aspects of Leydig cell function. *Adv Exp Med Biol* **424**: 125-138.
- Middendorff R, Muller D, Wichers S, Holstein AF, Davidoff MS (1997b). Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4154-4161.
- Mietens A, Tasch S, Feuerstacke C, Eichner G, Volkmann J, Schermuly RT, *et al.* (2012). Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not. *Mol Cell Endocrinol* **349**(2): 145-153.
- Mietens A, Tasch S, Stammeler A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R (2014). Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct--effects of cgmp signaling. *PLoS One* **9**(3): e92603.
- Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, *et al.* (2009). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **105**(10): 956-964.

- Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, *et al.* (2014). Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *Am J Med Genet A* **164A**(1): 156-163.
- Mokni W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB, *et al.* (2010). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS One* **5**(12): e14227.
- Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, *et al.* (1995). Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* **15**(1): 326-337.
- Morelli A, Filippi S, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Marini M, *et al.* (2004). Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology* **145**(5): 2253-2263.
- Morena AR, Boitani C, de Grossi S, Stefanini M, Conti M (1995). Stage and cell-specific expression of the adenosine 3',5' monophosphate-phosphodiesterase genes in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* **136**(2): 687-695.
- Mouledous L, Hunt S, Harcourt R, Harry J, Williams KL, Gutstein HB (2003). Navigated laser capture microdissection as an alternative to direct histological staining for proteomic analysis of brain samples. *Proteomics* **3**(5): 610-615.
- Movsesian MA (2000). Therapeutic potential of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors in heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* **9**(5): 963-973.
- Movsesian MA, Kukreja RC (2011). Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Handb Exp Pharmacol*(204): 237-249.
- Mukhopadhyay AK, Schumacher M, Leidenberger FA (1986). Steroidogenic effect of atrial natriuretic factor in isolated mouse Leydig cells is mediated by cyclic GMP. *Biochem J* **239**(2): 463-467.
- Muller D, Cortes-Dericks L, Budnik LT, Brunswig-Spickenheier B, Pancrati M, Speth RC, *et al.* (2006). Homologous and lysophosphatidic acid-induced desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A, in MA-10 leydig cells. *Endocrinology* **147**(6): 2974-2985.
- Muller D, Hildebrand M, Lubberstedt J, Kuhn M, Middendorff R (2010). The membrane receptors guanylyl cyclase-A and -B undergo distinctive changes in post-translational modification during brain development. *J Neurochem* **115**(4): 1024-1034.
- Muller D, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Middendorff R (2011). Cyclic GMP signaling in rat urinary bladder, prostate, and epididymis: tissue-specific changes with aging and in response to Leydig cell depletion. *Reproduction* **142**(2): 333-343.
- Muller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR, *et al.* (2004). Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* **145**(3): 1392-1401.
- Muller R, Klug J, Rodewald M, Meinhardt A (2005). Macrophage migration inhibitory factor suppresses transforming growth factor-beta2 secretion in cultured rat testicular peritubular cells. *Reprod Fertil Dev* **17**(4): 435-438.
- Muller D, Middendorff R, Olcese J, Mukhopadhyay AK (2002). Central nervous system-specific glycosylation of the type A natriuretic peptide receptor. *Endocrinology* **143**(1): 23-29.
- Muller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR, *et al.* (2004). Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* **145**(3): 1392-1401.

- Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, *et al.* (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* **403**(6765): 86-89.
- Murray F, MacLean MR, Pyne NJ (2003). An assessment of the role of the inhibitory gamma subunit of the retinal cyclic GMP phosphodiesterase and its effect on the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in animal and cellular models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* **138**(7): 1313-1319.
- Nikolova S, Guenther A, Savai R, Weissmann N, Ghofrani HA, Konigshoff M, *et al.* (2010). Phosphodiesterase 6 subunits are expressed and altered in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **11**: 146.
- Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee SA, Tiraihi T (2004). CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod* **19**(1): 124-128.
- Nili N, Cheema AN, Giordano FJ, Barolet AW, Babaei S, Hickey R, *et al.* (2003). Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Am J Pathol* **163**(3): 869-878.
- Nishimura K, Nishimura T, Onishi K, Oga T, Hasegawa Y, Jones PW (2014). Changes in plasma levels of B-type natriuretic peptide with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **9**: 155-162.
- Nistal M, Paniagua R, Riestra ML, Reyes-Mugica M, Cajaiba MM (2007). Bilateral prepubertal testicular biopsies predict significance of cryptorchidism-associated mixed testicular atrophy, and allow assessment of fertility. *Am J Surg Pathol* **31**(8): 1269-1276.
- O'Grady SM, Jiang X, Maniak PJ, Birmachu W, Scribner LR, Bulbulian B, *et al.* (2002). Cyclic AMP-dependent Cl secretion is regulated by multiple phosphodiesterase subtypes in human colonic epithelial cells. *J Membr Biol* **185**(2): 137-144.
- Odrzywolski KJ, Mukhopadhyay S (2010). Papillary cystadenoma of the epididymis. *Arch Pathol Lab Med* **134**(4): 630-633.
- Omori K, Kotera J (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* **100**(3): 309-327.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**(3): 767-801.
- Pandey KN (2011). The functional genomics of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A: perspectives and paradigms. *FEBS J* **278**(11): 1792-1807.
- Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, Barone C, Galileo DS, Strehler EE, *et al.* (2013). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biol Reprod* **89**(1): 6.
- Patrucco E, Albergine MS, Santana LF, Beavo JA (2010). Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**(2): 330-333.
- Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, Savineau JP (2003). Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* **139**(3): 513-522.
- Pelliccione F, Cordeschi G, Giuliani V, D'Abrizio P, Necozone S, Negri L, *et al.* (2004). The contractile wall of the caput epididymidis in men affected by congenital or postinflammatory obstructive azoospermia. *J Androl* **25**(3): 417-425.

- Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P (1988). Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(4): 1105-1108.
- Perez-Torres S, Miro X, Palacios JM, Cortes R, Puigdomenech P, Mengod G (2000). Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [<sup>3</sup>H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *J Chem Neuroanat* **20**(3-4): 349-374.
- Peri A, Fantoni G, Granchi S, Vannelli GB, Barni T, Amerini S, *et al.* (1998). Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. *Steroids* **63**(5-6): 294-298.
- Perrett RM, McArdle CA (2013). Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 180.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**: 105-149.
- Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, *et al.* (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* **74**(1): 185-194.
- Potter LR (2011a). Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* **23**(12): 1921-1926.
- Potter LR (2011b). Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther* **130**(1): 71-82.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* **27**(1): 47-72.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): C1-9.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12527-12531.
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE (1999). Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **84**(10): 3836-3844.
- Ramirez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramirez R, Becerril C, Segura L, *et al.* (2011). Absence of Thy-1 results in TGF-beta induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest* **91**(8): 1206-1218.
- Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Milne L, Cruickshanks L, Jeffrey N, *et al.* (2014). Sertoli cells maintain leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PLoS One* **9**(8): e105687.
- Reed TM, Repaske DR, Snyder GL, Greengard P, Vorhees CV (2002). Phosphodiesterase 1B knock-out mice exhibit exaggerated locomotor hyperactivity and DARPP-32 phosphorylation in response to dopamine agonists and display impaired spatial learning. *J Neurosci* **22**(12): 5188-5197.
- Rege TA, Hagood JS (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J* **20**(8): 1045-1054.

- Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, *et al.* (1995). Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* **95**(4): 1528-1538.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, *et al.* (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**(6856): 603-609.
- Ricker DD (1998). The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* **19**(1): 1-4.
- Ricupero DA, Poliks CF, Rishikof DC, Cuttle KA, Kuang PP, Goldstein RH (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(1): C99-C105.
- Robaire B, Hamzeh M (2011). Androgen action in the epididymis. *J Androl* **32**(6): 592-599.
- Robaire B, Viger RS (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* **52**(2): 226-236.
- Robinson JW, Dickey DM, Miura K, Michigami T, Ozono K, Potter LR (2013). A human skeletal overgrowth mutation increases maximal velocity and blocks desensitization of guanylyl cyclase-B. *Bone* **56**(2): 375-382.
- Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, *et al.* (2012). Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol* **366**(2): 308-316.
- Romano F, Gambarà G, De Cesaris P, Ziparo E, Palombi F, Filippini A (2007). Endothelin induces functional hypertrophy of peritubular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **212**(1): 264-273.
- Ropero AB, Soriano S, Tuduri E, Marroqui L, Tellez N, Gassner B, *et al.* (2010). The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* **151**(8): 3665-3674.
- Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* **152**(3): 159-166.
- Rossi F, Ferraresi A, Romagnì P, Silvestroni L, Santiemma V (2002). Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology* **143**(8): 3096-3104.
- Ruppert C, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Gunther A (2008). Role of coagulation and fibrinolysis in lung and renal fibrosis. *Hamostaseologie* **28**(1-2): 30-32, 34-36.
- Russell LD, Malone JP (1980). A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell* **12**(2): 263-285.
- Russell LD, Tallon-Doran M, Weber JE, Wong V, Peterson RN (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. *Am J Anat* **167**(2): 181-192.
- Russwurm C, Zoidl G, Koesling D, Russwurm M (2009). Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J Biol Chem* **284**(38): 25782-25790.
- Rutten K, Misner DL, Works M, Blokland A, Novak TJ, Santarelli L, *et al.* (2008). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in phosphodiesterase 4D-knockout (PDE4D) mice. *Eur J Neurosci* **28**(3): 625-632.
- Rutten K, Prickaerts J, Hendrix M, van der Staay FJ, Sik A, Blokland A (2007). Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: studies



- using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors. *Eur J Pharmacol* **558**(1-3): 107-112.
- Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, Rybalkina IG, Kwak KS, Hanson K, *et al.* (1997). Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* **100**(10): 2611-2621.
- Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA, Bornfeldt KE (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* **90**(2): 151-157.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* **93**(4): 280-291.
- Saito Y, Kishimoto I, Nakao K (2011). Roles of guanylyl cyclase--a signaling in the cardiovascular system. *Can J Physiol Pharmacol* **89**(8): 551-556.
- Sajjad Y (2010). Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *J Obstet Gynaecol Res* **36**(5): 929-937.
- Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD (1998). Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res* **43**(2): 163-168.
- Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M (1990). Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl* **13**(2): 135-146.
- Santiemma V, Beligotti F, Magnanti M, Palleschi S, Silvestroni L, Fabbrini A (1996). Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and contraction in testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod* **54**(3): 583-590.
- Santoro G, Romeo C, Impellizzeri P, Gentile C, Anastasi G, Santoro A (2000). Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril* **73**(4): 699-705.
- Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* **127**(6): 3180-3186.
- Sasaki T, Kotera J, Omori K (2004). Transcriptional activation of phosphodiesterase 7B1 by dopamine D1 receptor stimulation through the cyclic AMP/cyclic AMP-dependent protein kinase/cyclic AMP-response element binding protein pathway in primary striatal neurons. *J Neurochem* **89**(2): 474-483.
- Satelli A, Li S (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **68**(18): 3033-3046.
- Schachter M (1997). Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *Int J Cardiol* **62 Suppl 2**: S85-90.
- Schankin CJ, Kruse LS, Reinisch VM, Jungmann S, Kristensen JC, Grau S, *et al.* (2010). Nitric oxide-induced changes in endothelial expression of phosphodiesterases 2, 3, and 5. *Headache* **50**(3): 431-441.
- Scheepe JR, Amelink A, Wolffenbuttel KP, Kok DJ (2014). Influence of sildenafil on blood oxygen saturation of the obstructed bladder. *BMC Urol* **14**: 44.
- Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A (2008). Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* **149**(4): 1678-1686.
- Schell C, Albrecht M, Spillner S, Mayer C, Kunz L, Kohn FM, *et al.* (2010). 15-Deoxy-delta 12-14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human

testicular peritubular cells: implications for human male fertility. *Endocrinology* **151**(3): 1257-1268.

Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, Dumitrascu R, Tian X, Weissmann N, *et al.* (2007). Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* **115**(17): 2331-2339.

Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.

Schulz S (2005). C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides* **26**(6): 1024-1034.

Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, *et al.* (1989). The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* **58**(6): 1155-1162.

Schulze W, Rehder U (1984). Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res* **237**(3): 395-407.

Schumacher H, Matsuda Y, Mukhopadhyay AK (1993). HS-142-1 inhibits testosterone production and guanosine-3':5'-cyclic monophosphate accumulation stimulated by atrial natriuretic peptide in isolated mouse Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* **94**(1): 105-110.

Scipioni A, Stefanini S, Santone R, Giorgi M (2005). Immunohistochemical localisation of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. *Histochem Cell Biol* **124**(5): 401-407.

Sellak H, Choi CS, Dey NB, Lincoln TM (2013). Transcriptional and post-transcriptional regulation of cGMP-dependent protein kinase (PKG-I): pathophysiological significance. *Cardiovasc Res* **97**(2): 200-207.

Sellitti DF, Koles N, Mendonca MC (2011). Regulation of C-type natriuretic peptide expression. *Peptides* **32**(9): 1964-1971.

Setchell BP MSaBD (1994). 1994 Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. *Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press:* 1063–1175.

Seyler C, Duthil-Straub E, Zitron E, Gierten J, Scholz EP, Fink RH, *et al.* (2012). TASK1 (K(2P)3.1) K(+) channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation. *Br J Pharmacol* **165**(5): 1467-1475.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**(6): 769-784.

Shimizu-Albergine M, Tsai LC, Patrucco E, Beavo JA (2012). cAMP-specific phosphodiesterases 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell steroidogenesis. *Mol Pharmacol* **81**(4): 556-566.

Shiraishi K, Yoshida K, Fujimiya T, Naito K (2003). Angiotensin II dependent testicular fibrosis and effects on spermatogenesis after vasectomy in the rat. *J Urol* **170**(5): 2104-2108.

Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* **135**(6): 1108-1117.

Sigg C, Hedinger C (1981). Quantitative and ultrastructural study of germinal epithelium in testicular biopsies with "mixed atrophy". *Andrologia* **13**(5): 412-424.

- Silberbach M, Roberts CT, Jr. (2001). Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal* **13**(4): 221-231.
- Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Fujiwara RA, James LC, Williams RD, *et al.* (2006). Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology* **51**(2): 374-385.
- Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Reed TM, Vorhees CV, Repaske DR (2007). Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme. *Neuropharmacology* **53**(1): 113-124.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* **103**(6 Pt 2): 2787-2796.
- Skinner MK, Fritz IB (1985a). Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(1): 114-118.
- Skinner MK, Tung PS, Fritz IB (1985b). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* **100**(6): 1941-1947.
- Smrcka AV, Brown JH, Holz GG (2012). Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal* **24**(6): 1333-1343.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998). Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8991-8996.
- Sopory S, Kaur T, Visweswariah SS (2004). The cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5): intestinal cell expression, regulation and role in fluid secretion. *Cell Signal* **16**(6): 681-692.
- Spearing MK, Post RM, Leverich GS, Brandt D, Nolen W (1997). Modification of the Clinical Global Impressions (CGI) Scale for use in bipolar illness (BP): the CGI-BP. *Psychiatry Res* **73**(3): 159-171.
- Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, *et al.* (2011). cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* **108**(8): 929-939.
- Stangherlin A, Zaccolo M (2012). cGMP-cAMP interplay in cardiac myocytes: a local affair with far-reaching consequences for heart function. *Biochem Soc Trans* **40**(1): 11-14.
- Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, Adamowicz WO, O'Donnell MM, Muravnick KB, *et al.* (2009). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem* **57**(10): 933-949.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**(6159): 78-81.
- Sujarit S, Pholpramool C (1985). Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J Reprod Fertil* **74**(2): 497-502.
- Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, Beavo JA (2007). Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res* **101**(8): 811-818.
- Suresh PS, Rajan T, Tsutsumi R (2011). New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. *Endocr J* **58**(4): 223-235.
- Tahseldar-Roumieh R, Keravis T, Maarouf S, Justiniano H, Sabra R, Lugnier C (2009). PDEs1-5 activity and expression in tissues of cirrhotic rats reveal a role for aortic PDE3 in NO desensitization. *Int J Exp Pathol* **90**(6): 605-614.

- Tainio H (1994). Peptidergic innervation of the human testis and epididymis. *Acta Histochem* **96**(4): 415-420.
- Takimoto E (2012). Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* **76**(8): 1819-1825.
- Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, *et al.* (2007). Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* **115**(16): 2159-2167.
- Tang Z, Wang A, Wang D, Li S (2013). Smooth muscle cells: to be or not to be? Response to Nguyen *et al.* *Circ Res* **112**(1): 23-26.
- Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, *et al.* (2012). Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun* **3**: 875.
- Tasken KA, Collas P, Kemmner WA, Witczak O, Conti M, Tasken K (2001). Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area. *J Biol Chem* **276**(25): 21999-22002.
- Tate RJ, Arshavsky VY, Pyne NJ (2002). The identification of the inhibitory gamma-subunits of the type 6 retinal cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase in non-retinal tissues: differential processing of mRNA transcripts. *Genomics* **79**(4): 582-586.
- Thompson IR, Chand AN, King PJ, Ansorge O, Karavitaki N, Jones CA, *et al.* (2012). Expression of guanylyl cyclase-B (GC-B/NPR2) receptors in normal human fetal pituitaries and human pituitary adenomas implicates a role for C-type natriuretic peptide. *Endocr Relat Cancer* **19**(4): 497-508.
- Thong A, Muller D, Feuerstacke C, Mietens A, Stammeler A, Middendorff R (2014). Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells--its relevance for CNP degradation. *Mol Cell Endocrinol* **382**(1): 234-243.
- Tian X, Vroom C, Ghofrani HA, Weissmann N, Bieniek E, Grimminger F, *et al.* (2011). Phosphodiesterase 10A upregulation contributes to pulmonary vascular remodeling. *PLoS One* **6**(4): e18136.
- Tilley DG, Maurice DH (2002). Vascular smooth muscle cell phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 activities and levels are regulated by cyclic AMP in vivo. *Mol Pharmacol* **62**(3): 497-506.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-363.
- Triphan J, Aumuller G, Brandenburger T, Wilhelm B (2007). Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *Eur J Cell Biol* **86**(5): 265-273.
- Tripiciano A, Peluso C, Morena AR, Palombi F, Stefanini M, Ziparo E, *et al.* (1999). Cyclic expression of endothelin-converting enzyme-1 mediates the functional regulation of seminiferous tubule contraction. *J Cell Biol* **145**(5): 1027-1038.
- Tsai LC, Chan GC, Nangle SN, Shimizu-Albergine M, Jones GL, Storm DR, *et al.* (2012). Inactivation of Pde8b enhances memory, motor performance, and protects against age-induced motor coordination decay. *Genes Brain Behav* **11**(7): 837-847.
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA (2006). Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* **364**(1-2): 33-60.

- Tung PS, Fritz IB (1991). Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor synergistically stimulate contraction by testicular peritubular cells in culture in serum-free medium. *J Cell Physiol* **146**(3): 386-393.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* **23**(3): 261-269.
- Turner TT, Howards SS (1978). Factors involved in the initiation of sperm motility. *Biol Reprod* **18**(4): 571-578.
- Turner TT, Johnston DS, Jelinsky SA, Tomsig JL, Finger JN (2007). Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian J Androl* **9**(4): 565-573.
- Tuttelmann F, Dykstra N, Themmen AP, Visser JA, Nieschlag E, Simoni M (2009). Anti-Mullerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with maldescended testes. *Fertil Steril* **91**(5): 1812-1819.
- Ungefroren H, Ergun S, Krull NB, Holstein AF (1995). Expression of the small proteoglycans biglycan and decorin in the adult human testis. *Biol Reprod* **52**(5): 1095-1105.
- Vaalasti A, Tainio H, Pelto-Huikko M, Hervonen A (1986). Light and electron microscope demonstration of VIP- and enkephalin-immunoreactive nerves in the human male genitourinary tract. *Anat Rec* **215**(1): 21-27.
- Vasta V, Shimizu-Albergine M, Beavo JA (2006). Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(52): 19925-19930.
- Veeramachaneni DN, Amann RP (1990). Oxytocin in the ovine ductuli efferentes and caput epididymidis: immunolocalization and endocytosis from the luminal fluid. *Endocrinology* **126**(2): 1156-1164.
- Vervoort SJ, Lourenco AR, van Boxtel R, Coffey PJ (2013). SOX4 mediates TGF-beta-induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One* **8**(1): e53238.
- Vettel C, Lammle S, Ewens S, Cervigien C, Emons J, Ongherth A, *et al.* (2014). PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**(8): H1246-1252.
- Vijayagopal P, Subramaniam P (2001). Effect of calcium channel blockers on proteoglycan synthesis by vascular smooth muscle cells and low density lipoprotein--proteoglycan interaction. *Atherosclerosis* **157**(2): 353-360.
- Volkman J, Muller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, Muhlfield C, *et al.* (2011). Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Hum Reprod* **26**(6): 1450-1461.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* **134**(5): 2307-2316.
- Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P (1999). Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* **83**(5A): 3C-12C.

- Wang C, Yin S, Cen L, Liu Q, Liu W, Cao Y, *et al.* (2010). Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Eng Part A* **16**(4): 1201-1213.
- Wang X, Zhao T, Zhou S, Sun L, Zhang L, Yu G (2014). Mg(2)(+)-dependent modulation of BKCa channels by genistein in rat arteriolar smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **229**(12): 1981-1989.
- Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R, *et al.* (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res* **17**(3): 216-223.
- Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, *et al.* (2012). Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca<sup>2+</sup> absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. *J Biol Chem* **287**(22): 17930-17941.
- Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, *et al.* (2011). Male fertility depends on Ca(2)+ absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Sci Signal* **4**(171): ra27.
- Welch C, Watson ME, Poth M, Hong T, Francis GL (1995). Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis. *Metabolism* **44**(2): 234-238.
- Welch JE, Swinnen JV, O'Brien DA, Eddy EM, Conti M (1992). Unique adenosine 3',5' cyclic monophosphate phosphodiesterase messenger ribonucleic acids in rat spermatogenic cells: evidence for differential gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* **46**(6): 1027-1033.
- Welsh M, Moffat L, Belling K, de Franca LR, Segatelli TM, Saunders PT, *et al.* (2012). Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. *Int J Androl* **35**(1): 25-40.
- Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB (2009). Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J* **23**(12): 4218-4230.
- Welter H, Kampfer C, Lauf S, Feil R, Schwarzer JU, Kohn FM, *et al.* (2013). Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology* **1**(2): 318-324.
- Wen XH, Dizhoor AM, Makino CL (2014). Membrane guanylyl cyclase complexes shape the photoresponses of retinal rods and cones. *Front Mol Neurosci* **7**: 45.
- Werler S, Demond H, Damm OS, Ehmcke J, Middendorff R, Gromoll J, *et al.* (2014). Germ cell loss is associated with fading Lin28a expression in a mouse model for Klinefelter's syndrome. *Reproduction* **147**(3): 253-264.
- Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, *et al.* (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**(6474): 859-863.
- White CW, Choong YT, Short JL, Exintaris B, Malone DT, Allen AM, *et al.* (2013). Male contraception via simultaneous knockout of alpha1A-adrenoceptors and P2X1-purinoreceptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(51): 20825-20830.
- Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca<sup>2+</sup> entry into sperm. *J Cell Biol* **142**(2): 473-484.
- Willipinski-Stapelfeldt B, Lubberstedt J, Stelter S, Vogt K, Mukhopadhyay AK, Muller D (2004). Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signalling in human sperm. *Mol Hum Reprod* **10**(7): 543-552.

- Wright PT, Nikolaev VO, O'Hara T, Diakonov I, Bhargava A, Tokar S, *et al.* (2014). Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* **67**: 38-48.
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**(5136): 1065-1069.
- Wu Q, Shi J, Chen L, Wang CY, Park I, Lee C, *et al.* (2008). Regulation of proliferation and differentiation of prostatic stromal cells by oestradiol through prostatic epithelial cells in a paracrine manner. *BJU Int* **101**(4): 497-502.
- Wu X, Yang T, Zhou Q, Li S, Huang L (2014). Additional use of a phosphodiesterase 5 inhibitor in patients with pulmonary hypertension secondary to chronic systolic heart failure: a meta-analysis. *Eur J Heart Fail* **16**(4): 444-453.
- Xia W, Mruk DD, Cheng CY (2007). C-type natriuretic peptide regulates blood-testis barrier dynamics in adult rat testes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 3841-3846.
- Xie Z, Adamowicz WO, Eldred WD, Jakowski AB, Kleiman RJ, Morton DG, *et al.* (2006). Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience* **139**(2): 597-607.
- Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (2000). Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod* **15**(7): 1543-1547.
- Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Loughney K, Ferguson K, Beavo JA (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9677-9681.
- Yan C, Zhao AZ, Sonnenburg WK, Beavo JA (2001). Stage and cell-specific expression of calmodulin-dependent phosphodiesterases in mouse testis. *Biol Reprod* **64**(6): 1746-1754.
- Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY (2008). An autocrine axis in the testis that coordinates spermiogenesis and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(26): 8950-8955.
- Yang G, McIntyre KW, Townsend RM, Shen HH, Pitts WJ, Dodd JH, *et al.* (2003). Phosphodiesterase 7A-deficient mice have functional T cells. *J Immunol* **171**(12): 6414-6420.
- Yaseen H, Darwich M, Hamdy H (2012). Is sildenafil an effective therapy in the management of persistent pulmonary hypertension? *J Clin Neonatol* **1**(4): 171-175.
- Yasoda A, Nakao K (2010). Translational research of C-type natriuretic peptide (CNP) into skeletal dysplasias. *Endocr J* **57**(8): 659-666.
- Yeung CH, Wang K, Cooper TG (2012). Why are epididymal tumours so rare? *Asian J Androl* **14**(3): 465-475.
- Yougbare I, Keravis T, Abusnina A, Decossas M, Schall N, Muller S, *et al.* (2014). Cyclic GMP catabolism up-regulation in MRL/lpr lupus-prone mice is associated with organ remodeling. *Biochim Biophys Acta* **1842**(7): 916-926.
- Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, Omori K (2000). Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem* **275**(40): 31469-31479.
- Zaccolo M, Movsesian MA (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* **100**(11): 1569-1578.

- Zelevsky MJ, Shasha D, Branco RD, Kollmeier M, Baser RE, Pei X, *et al.* (2014). Prophylactic sildenafil citrate improves select aspects of sexual function in men treated with radiotherapy for prostate cancer. *J Urol* **192**(3): 868-874.
- Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, *et al.* (2006a). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17718-17723.
- Zhang H, Frederick JM, Baehr W (2014). Unc119 gene deletion partially rescues the GRK1 transport defect of Pde6d (-/-) cones. *Adv Exp Med Biol* **801**: 487-493.
- Zhang XS, Zhang ZH, Jin X, Wei P, Hu XQ, Chen M, *et al.* (2006b). Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. *Endocrinology* **147**(3): 1237-1245.
- Zhihui Q (2013). Modulating nitric oxide signaling in the CNS for Alzheimer's disease therapy. *Future Med Chem* **5**(12): 1451-1468.
- Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* **245**(3): 509-518.
- Zini A, Schlegel PN (1996). Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl* **17**(5): 473-480.
- Zini A, Schlegel PN (1997). Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *J Urol* **158**(2): 659-663.



## 12 Publikationen

Volkman J, Müller D, **Feuerstacke C**, Kliesch S, Bergmann M, Mühlfeld C, Middendorff R 2011.

**Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts.**

**Hum Reprod.** 26(6):1450-61.

Mietens A, Tasch S, **Feuerstacke C**, Eichner G, Volkman J, Schermuly RT, Grimminger F, Müller D, Middendorff R. 2012

**Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not.**

**Mol Cell Endocrinol.** 349(2):145-53.

Thong A, Müller D, **Feuerstacke C**, Mietens A, Stammeler A, Middendorff R. 2014

**Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells-its relevance for CNP degradation.**

**Mol Cell Endocrinol.** 382(1):234-43.

Bartel J, **Feuerstacke C**, Galuska CE, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Münster-Kühnel A, Middendorff R, Galuska SP.

**Laser microdissection of paraffin embedded tissue as a tool to estimate the sialylation status of selected cell populations.**

**Anal Chem.** 2014 Mar 4;86(5):2326-31.

Mietens A, Tasch S, Stammeler A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R. 2014

**Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct - effects of cgmp signaling.**

**PLoS One.** 9(3):92603.

## **Vorträge**

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2010).**

**Characterization of phosphodiesterase isoforms expressed in contractile cells of the human testis and epididymis.**

3<sup>rd</sup> GGL Conference of Life Sciences, Giessen

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2012).**

**Contractile cell function and sperm transport: Visualization and cGMP effects in testis.**

ETW-Conference, Stockholm, Schweden

**Feuerstacke, C. (2014).**

**Laser Mikrodisektion.**

Im Rahmen einer Vortragsreihe des GGL, Giessen.

## **Poster**

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2009).**

**Detection of components of cGMP signalling pathways in the human testis by laser capture microdissection (LCM), both at mRNA and protein level.**

2<sup>nd</sup> GGL Conference of Life Sciences, Giessen

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2011).**

**PDE expression and contractility of seminiferous tubules and epididymal duct of the human testis.**

4<sup>th</sup> GGL Conference of Life Sciences, Giessen

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2011).**

**PDE expression and PDE-related contractility of seminiferous tubules of the testis.**

28. Tagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2011).**

**PDE expression and contractility of seminiferous tubules of the human testis.**

cGMP-Kongress, Halle

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2012).**

**Function of cGMP hydrolyzing PDEs in epididymis of rat and men.**

29. Tagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2012).**

**Visualization of sildenafil effects in testis**

Andrologie Kongress, Berlin

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2013).**

**Isolated peritubular cells of seminiferous tubules under culture conditions.**

DVR-Kongress, Münster

**Feuerstacke, C., Middendorff, R. (2014).**

**Comparison of isolated peritubular cells of seminiferous tubules with classical smooth muscle cells.**

DGA-Kongress, Giessen

## **Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Middendorff für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die regelmäßigen, anregenden Diskussionen. Seine Unterstützung und Zuversicht waren von unschätzbarem Wert für mich. Danke für die wundervolle Zeit und die witzigen Anekdoten.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Andrea Mietens für viele fachliche und private Diskussionen. Dein breites Interessensfeld und deine klinischen Grundlagen haben mir über die Jahre sehr geholfen. Außerdem danke ich dir für die fantastischen und eigentlich unvorstellbaren Storys deines Lebens.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Dieter Müller für die freundliche und umfassende Beratung in Fachfragen und die umwerfend tolle Party, die er anlässlich seines Abschieds gegeben hat.

Ein überaus herzliches „DANKE SCHÖN!!“ und noch viel, viel mehr als das gilt meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, den aktuellen wie den ehemaligen, die mit einem gekämpft, gelitten und gejubelt haben.

Taschi und Silke sind nicht unwesentlich am Gelingen dieser Doktorarbeit beteiligt. Ihr seid das Beste was mir während der Doktorarbeit passieren konnte. Danke auch an Susti und für die Aufnahme in den Club der „fiesen Alten“.

1000 Dank auch an alle Doktoranden mit denen ich so viel Spass über die Jahre hatte. An vorderster Front kämpfen: Peter, Thorben, Scheppi, Robert, Merle, Alina, Ludmilla, Kimi und Ansgar. Den TAs meiner Arbeitsgruppe, Andre und Ingrid, danke ich für die große Hilfe und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Johanna Volkmann, die vor mir dieses Thema bearbeitet hat.

Frau Prof. Dr. Baumgart-Vogt und dem Sekretariat des Graduiertenkollegs GGL möchte ich für die Möglichkeiten der Erweiterung meines Horizontes durch die wöchentlichen Seminare danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer danke ich sehr für die Erlaubnis, die Laborarbeiten in seiner Abteilung durchführen zu dürfen, wo mir stets alle nötigen Materialien und Geräte zur Verfügung standen. Außerdem geht ein großer Dank an die TAs und wissenschaftlichen Mitarbeiter der AG Kummer. Vor allem Dr. Pfeil danke ich für seine Geduld und seinen wunderbaren, trockenen Humor.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Mühlfeld für bissige, spritzige und witzige Gespräche und Kommentare. Danke für die coole Zeit in Göttingen und auf verschiedenen Kongressen zusammen mit Tillmann und Lars. Schade dass ich den „Rattenkönig“ nicht mehr zu Gesicht bekommen habe.

Ein weiterer großer Dank geht an Herrn Anderl für die gute Trink- und Umzugsunterstützung. Ebenfalls einen großen Dank an Frau Wewel ohne deren Organisationstalent wir alle wohl im Chaos versinken würden.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Daniela Fietz und Prof. Dr. Martin Bergmann für die Bereitstellung der menschlichen Hodenbiopsien.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung, nicht nur während der Doktorarbeit, sondern auch schon während des Studiums an meiner Seite waren. Danke Sascha, dass wir immer zusammen leiden und lachen konnten. Danke an Liese, Flo, Janosch, Aline, Ben, Mitch, Kathi, Koschi, Pelle, Düse und JULIAN. Ich bin verliebt in euch.

Allen, die direkt oder indirekt zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben und hier versehentlich nicht namentlich erwähnt sind, gilt ebenfalls mein besonderer Dank.



Bei meiner Mutti und meinen Omas, die mir das Studium ermöglicht haben, und für ihre unendliche Unterstützung möchte ich mich besonders herzlich bedanken.